AUSTAUSCH ALIPHATISCHER UND BASISCHER AMINOSÄUREN IN SYNTHETISCHEN INSULIN-B-KETTEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Jörg Martin
aus Leipzig

1970

AUSTAUSCH ALIPHATISCHER UND BASISCHER AMINOSÄUREN IN SYNTHETISCHEN INSULIN-B-KETTEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Jörg Martin
aus Leipzig

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Dezember 1970

Dekan: Prof. Dr. H. Auterhoff

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. G. Weitzel
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Graf

Die vorliegende Arbeit wurde auf Veranlassung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. Dr. Günther Weitzel im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem Lehrer danke ich für die Überlassung des Themas und für die während dessen Bearbeitung erwiesene großzügige Förderung.

Herrn Dr. U. Weber, Herrn Dr. K. Eisele, Herrn Diplom-Biochemiker H. Großmann und Herrn Dr. K.-H. Herzog bin ich für wertvolle Ratschläge und Unterstützung zu Dank verpflichtet.

Frau Dr. A.-M. Fretzdorff danke ich für die Durchführung von Aminosäureanalysen und Frau E. Hofmann für die Aktivitätsbestimmung im Mäusefalltest.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2.	EXPERIMENTELLER TEIL	5
2.1	Ausgangsmaterial und Hilfsstoffe	5
2.2	Analytische Methoden	6
2.3	Darstellung von natürlicher S-Sulfonat-A-Kette aus Rinderinsulin	7
2.4	Rekombination der natürlichen und synthetischen S-Sulfonat-B-Kette mit natürlicher A-Kette des Rinderinsulins	8
2.5	Mäusefalltest	9
2.6	Darstellung des Chlormethylharzes	10
2.7	Darstellung des t-BOC-Alanin-Harzes	10
2.8	Darstellung der geschützten und aktivierten Aminosäuren	10
2.9	Synthese der geschützten B-Ketten nach der Merrifield-Methode mit DCCI als Kupplungsreagenz	22
2.10	Synthese der geschützten B-Ketten nach der Merrifield-Methode unter Verwendung von t-BOC-aminosäure-p-nitrophenylestern	24
2.11	Abspaltung der synthetischen B-Kette vom Harz	24
2.12	Abspaltung der S-Bzl-, N^{G}-Tos- und N^{im}-Bzl-Reste mit Natrium in flüssigem Ammoniak	25
2.13	Sulfitolyse der reduzierten B-Kette	25
3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	27
3.1	Austausch von Tyrosin B 16 gegen Alanin	27
3.2	Gemeinsamer Austausch von Leucin B 15 und Leucin B 17 gegen Alanin	28
3.3	Austausch von Leucin B 17 bzw. Leucin B 15 gegen Alanin in zwei verschiedenen B-Ketten	28
3.4	Synthese einer [Ala^{16}, Ala^{27}]-B-Kette (1 - 27)	29
3.5	Synthese einer [Ala^{9}, Ala^{16}, Ala^{27}]-B-Kette (1 - 27)	30

Seite

3.6 Austausch von Leucin B 11 bzw. Leucin B 6 gegen Alanin in zwei verschiedenen B-Ketten 30

3.7 Austausch von Valin B 12 und Valin B 18 gegen Alanin 31

3.8 Austausch von Valin B 12 bzw. Valin B 18 gegen Alanin in zwei verschiedenen B-Ketten 32

3.9 Austausch von Histidin B 5 und B 10 sowie Arginin B 22 gegen Alanin 34

3.9.1 Synthese einer [Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{27}]-B-Kette und einer [Ala^{5}, Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{27}]-B-Kette 34

3.9.2 Austausch von Arginin B 22 gegen Alanin 37

3.10 Rekombination von natürlicher Rinderinsulin-A-Kette mit natürlicher Rinderinsulin-B-Kette 38

4. REINIGUNG DER SYNTHETISCHEN S-SULFONAT-B-KETTEN 45

4.1 Reinigung der [Ala^{9}, Ala^{16}, Ala^{27}]-B-Kette (1 - 27) durch Ionenaustauschchromatographie an Dowex 50 WX 2 45

4.2 Reinigung der [Ala^{9}, Ala^{16}, Ala^{17}, Ala^{27}]-B-Kette (1 - 27) und anschließende Reinigung des Hybridinsulins 47

4.3 Reinigung der [Ala^{9}, Ala^{22}, Ala^{27}]-B-Kette (1 - 27) 48

5. ZUSAMMENFASSUNG 56

6. LITERATURVERZEICHNIS 58

7. LEBENSLAUF 62

Abkürzungen und Symbole der Aminosäuren, Peptide und ihrer Derivate richten sich nach den von der IUPAC-IUB Kommission für biochemische Nomenklatur herausgegebenen Regeln.

J. biol. Chem. 241, 2491 (1966)

Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 256 (1967)

$ASSO_3^-$ = S-Sulfonatform der A-Kette

$BSSO_3^-$ = S-Sulfonatform der B-Kette

Bzl- = Benzyl

t-BOC = t-Butyloxycarbonyl

CH_2Cl_2 = Methylenchlorid

DCCI = Dicyclohexylcarbodiimid

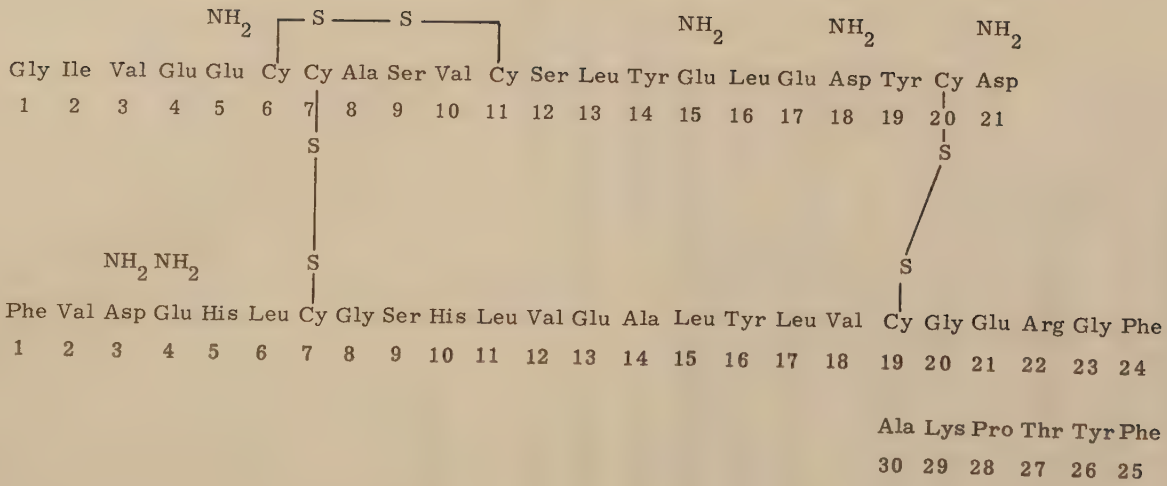
DMF = Dimethylformamid

TFA = Trifluoressigsäure

THF = Tetrahydrofuran,

Tos = Tosyl

pNP = p-Nitrophenylester



Formel des Rinderinsulins

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Zur Klärung der Zusammenhänge zwischen Struktur und Aktivität des Insulins gibt es verschiedene Möglichkeiten. Man kann z. B. durch Modifikation einzelner funktioneller Gruppen des Insulins die Bedeutung bestimmter Aminosäuren für die biologische Wirkung untersuchen. Diese Methode ist jedoch begrenzt, da nicht alle im Insulin vorkommenden Aminosäuren auf diese Weise verändert werden können; außerdem werden bei Modifikation einer bestimmten funktionellen Gruppe oft andere Gruppen in Mitleidenschaft gezogen.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz der einzelnen Tierspezies gibt nur unsicheren Aufschluß über die Zusammenhänge zwischen Struktur und biologischer Aktivität, da übereinstimmende Sequenzbereiche nicht unbedingt für die Hormonaktivität notwendig sein müssen. Dagegen gestattet es die synthetische Darstellung von Insulinketten, durch Austausch der interessierenden Aminosäuren exakte Aussagen machen zu können über die Notwendigkeit einzelner Aminosäuren für die biologische Aktivität des Insulins.

Bisher wurden an der B-Kette des Rinderinsulins folgende Variationen vorgenommen:
Die Aminosäuren Asparagin B 3, Glutamin B 4, Serin B 9 wurden jeweils durch L-Alanin ersetzt. Die Ketten zeigten nach Rekombination mit natürlicher $ASSO_3^-$-Kette des Rinderinsulins keinen Aktivitätsverlust im Vergleich mit einer synthetischen B-Kette natürlicher Sequenz. Auch eine Des-Phe^1-B-Kette und eine [Des-Phe^1-, Des Val^2-, Ala^4]-

B-Kette zeigte keinen Wirkungsverlust [1].

Darüberhinaus erwies sich [2], daß ziemlich weitgehende Kürzungen sowohl am Amino- als auch am Carboxylende der B-Kette ohne Wirkungsverlust durchgeführt werden können. Eine Verkürzung um drei Aminosäuren am Carboxylende und Austausch von Threonin B 27 gegen Alanin führt zu einer B-Kette mit relativ hoher Primäraktivität [2]. Ebenfalls untersucht wurde die Bedeutung von Lysin B 29, Prolin B 28, Threonin B 27 und Tyrosin B 26; diese Aminosäuren wurden ebenfalls durch Alanin ersetzt [2].

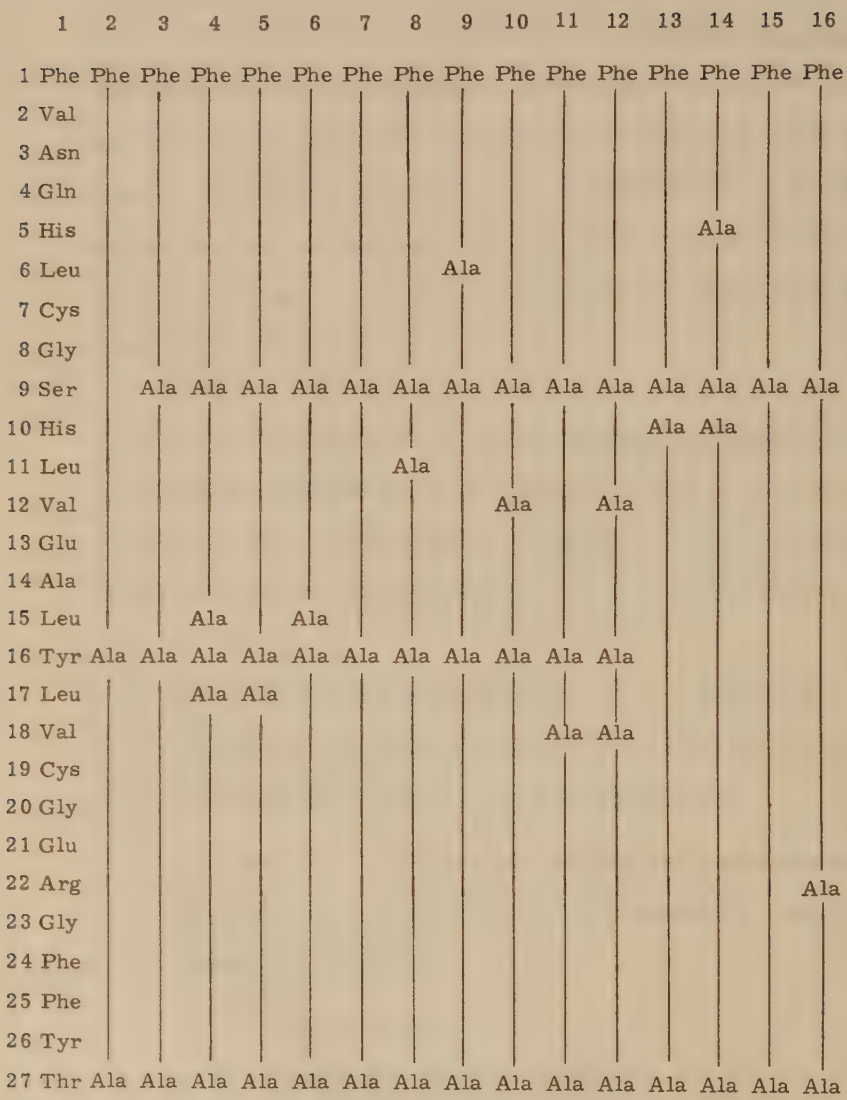
Es war nun erwünscht, Näheres über die noch nicht untersuchten aliphatischen Aminosäuren wie z. B. Leucin B 6, B 11, B 15 und B 17 zu erfahren, sowie die vorhandenen Kenntnisse über die Bedeutung der basischen Aminosäuren Histidin B 5 und B 10 sowie Arginin B 22 zu vertiefen.
In der Festkörpersynthese nach MERRIFIELD [3 - 8] bot sich eine geeignete Methode an, um durch Austausch der einzelnen Aminosäuren deren Signifikanz für die Insulinwirkung zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Synthese sequenzvariierter Insulin-B-Ketten, in denen die folgenden Aminosäuren gegen L-Alanin ausgetauscht wurden:

1. Tyrosin B 16
2. Leucin B 6, B 11, B 15 und B 17
   Serin B 9
   Valin B 12 und B 18
3. Histidin B 5, B 10 und Arginin B 22

Die synthetischen B-Ketten wurden mit natürlicher Rinderinsulin-A-Kette zum Hybridinsulin kombiniert und dessen biologische Aktivität bestimmt.

Abb. 1: Schema der synthetisierten B-Ketten


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
1 Phe Phe Phe Phe Phe Phe Phe Phe Phe Phe Phe Phe Phe Phe Phe Phe
2 Val
3 Asn
4 Gln
5 His
6 Leu
7 Cys
8 Gly
9 Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
10 His
11 Leu
12 Val
13 Glu
14 Ala
15 Leu
16 Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
17 Leu
18 Val
19 Cys
20 Gly
21 Glu
22 Arg
23 Gly
24 Phe
25 Phe
26 Tyr
27 Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
Ala
Ala

2. EXPERIMENTELLER TEIL

2.1 Ausgangsmaterial und Hilfsstoffe

L-Aminosäuren wurden in der von den Firmen Ajinomoto Co., Merck und Serva gelieferten Reinheit benutzt.

tert.-Butyloxycarbonyl-hydrazid, Fluka AG, Buchs/Schweiz.

Die natürliche gereinigte B-Kette wurde mir freundlicherweise von Herrn Diplom-Biochemiker H. Großmann zur Verfügung gestellt.

Dicyclohexylcarbodiimid: Zur Synthese, Merck AG, Darmstadt.

Dowex Ionenaustauschharz 50 wx 2.

Elektrophoresepapier: Nr. 2043 b mgl., Schleicher und Schüll.

Dialysierschlauch: Visking-Dialyseschlauch 18/32, Serva Entwicklungslabor, Heidelberg.

Insulin: Kristallines Rinderinsulin, Farbwerke Hoechst, 27 I.E./mg, Zinkgehalt ca. 0,3 %.

2-Mercaptoäthanol: Zur Synthese, LAB, Merck AG, Darmstadt

Merrifield Polymer: Copolymer aus 98 % Styrol und 2 % Divinylbenzol 200 - 400 mesh, Fluka AG, Buchs/Schweiz.

Sephadex G 50 superfine und Sephadex G 25 fine, Pharmacia, Uppsala/Schweden.

Triäthylamin: puriss. p.a., Fluka AG, Buchs/Schweiz.

Trifluoressigsäure: Merck AG, Darmstadt.

Alle übrigen Hilfsstoffe wurden von den Firmen Merck AG, Riedel de Haen und Hoechst in dem erforderlichen Reinheitsgrad bezogen.

Die Absolutierung aller Lösungsmittel erfolgte nach den in der Literatur angegebenen Verfahren.

Die komprimierten Gase Ammoniak, Chlorwasserstoff, Bromwasserstoff und Stickstoff wurden Stahlflaschen entnommen und hatten ca. 98%ige Reinheit.

2.2 Analytische Methoden

2.2.1 Quantitative Aminosäureanalyse:

Die Aminosäureanalysen wurden in einem Unichrom Aminosäureanalysator der Firma Beckman Instruments GmbH, München, durchgeführt. Die Peptide wurden 24 oder 48 Stdn. mit 6 N HCl unter Stickstoffatmosphäre in zugeschmolzenen Spezialreagenzgläsern bei 110 °C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde im Vakuum in einem Spitzkölbchen bis zur Trockne eingeengt und zum Auftragen auf den Aminosäureanalysator in einer entsprechenden Menge Citratpuffer pH 2,2 aufgenommen.

2.2.2 Papierelektrophorese:

Die Elektrophoresen wurden in einer SHANDON-Elektrophoresekammer durchgeführt. Die Pufferlösung hatte folgende Zusammensetzung:

10 % Essigsäure

15 % Ameisensäure in

4 M Harnstoff, pH 1,9

Laufzeit: 5 - 8 Stdn. bei 200 V und 10 - 12 mA

Nach 4stündigem Trocknen über einem Heißluftgebläse erfolgte das Anfärben mit einer frischbereiteten Lösung von Pauly's Reagenz (ca. 100 mg diazotierte Sulfanilsäure in 20 ml 5%iger Sodalösung gelöst).

2.2.3 Spezifische Drehwerte der geschützten Aminosäuren:

Die Drehwerte wurden mit einem lichtelektrischen Präzisionspolarimeter der Firma Carl Zeiss, Oberkochen/Württ., gemessen.

2.2.4 Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Apparat nach Tottoli der Firma Büchi, Schweiz, ermittelt.

2.3 Darstellung von natürlicher S-Sulfonat-A-Kette aus Rinderinsulin

Die für die Rekombination mit den synthetischen B-Ketten notwendige natürliche A-Kette wurde durch oxydative Sulfitolyse aus Rinderinsulin nach DU et al. [9] mit einer etwas abgeänderten Methode gewonnen:
2,0 g Insulin wurden in 80 ml 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4 und 4 M Harnstoff gelöst, mit 2,8 g Natriumsulfit und 1,5 g Natriumtetrathionat [10] versetzt, dann 17 Stdn. bei Raumtemperatur belassen. Danach wurde unter häufigem Wasserwechsel 6 Stdn. bei ca. + 3 °C dialysiert. Der Schlauchinhalt wurde unter Rühren am pH-Stat auf pH 6,4 gebracht und die ausgefallene B-Kette nach 10 Min. bei 0 °C abzentrifugiert.
Der Überstand enthielt die A-Kette. Den Niederschlag wirbelte man in ca. 100 ml Wasser auf und löste ihn durch tropfenweise Zugabe von 1 N NH_3, ohne pH 9,0 zu überschreiten. Durch Einstellen auf pH 6,4 mit 1 N Essigsäure wurde wieder gefällt und abzentrifugiert. Die beiden Überstände wurden lyophilisiert, dann in ca. 50 ml H_2O aufgenommen, mit 1 N Essigsäure am pH-Stat auf pH 5,0 gebracht, 1 Std. im Eisbad stehengelassen, abzentrifugiert und der Überstand 6 Stdn. bei + 3 °C dialysiert.
Nach Gefriertrocknung wurde das A-Kettenprodukt in ca. 5 ml 2,4 M Ameisensäurepuffer 8 M an Harnstoff aufgenommen und über Dowex 50 WX 2 von Verunreinigungen durch S-Sulfonat-B-Kette befreit. Das Eluat wurde 12 Stdn. bei + 3 °C dialysiert, am pH-Stat mit 0,1 N NaOH

auf pH 5,0 eingestellt und lyophilisiert. Die durchschnittliche Ausbeute an $ASSO_3^-$-Kette betrug 25 %, bezogen auf die eingewogene Insulinmenge. Auf dem Elektropherogramm war keine Verunreinigung der A-Kette durch B-Kette mehr zu erkennen (Abb. 7). Außerdem wurde die A-Kette noch mit sich selbst rekombiniert und im Mäusefalltest untersucht. Die Verunreinigung durch B-Kette lag unter 0,01 % (Tabelle 7).

2.4 Rekombination der natürlichen und synthetischen S-Sulfonat-B-Kette mit natürlicher A-Kette des Rinderinsulins

Die Rekombinationen erfolgten in etwas abgeänderter Weise nach KATSOYANNIS [11] und GROSSMANN [12] durch Umsetzung von $BSSO_3^-$-Kette mit einem 4fachen Überschuß an reduzierter A-Kette. Die Lösungen für Rekombination und Reduktion wurden mit unter Stickstoffatmosphäre gekochtem, bidestilliertem Wasser bereitet.

20 mg nat. $ASSO_3^-$-Kette wurden in 5 ml H_2O bidest. gelöst, auf pH 5,0 eingestellt, unter Eiskühlung und Stickstoffeinleiten in einer Kutscher-Steudel-Apparatur mit 1 ml 1 M Mercaptoäthanollösung versetzt und 5 Min. so belassen. Anschließend wurde unter weiterem Stickstoffeinleiten 6 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen der jetzt gallertigen Suspension extrahierte man unter Eiskühlung das Mercaptoäthanol ca. 3 Stdn. mit Essigester. Mit einer Kapillare wurde danach der überstehende Essigester abgesaugt und zur Verflüchtigung des Restes an Essigester 10 Min. ein starker Stickstoffstrom durchgeleitet, bis kein Essigestergeruch mehr wahrnehmbar war. Nun wurde die Suspension auf eine genau abgewogene Menge von ca. 5 mg $BSSO_3^-$-Kette gegeben, das Gefäß mit 2 ml H_2O bidest. nachgespült und die Lösung unter Eiskühlung mit 0,1 N NaOH auf pH 10,6

gebracht. Mit 2 ml 0,1 M Glycinpuffer pH 10,6 wurde das Rekombinationsgefäß nochmals nachgespült und der Puffer zu der Lösung gegeben. Nach 22stündigem Rühren bei + 2 °C im offenen Gefäß wurde das Rekombinationsprodukt mit 0,1 N Essigsäure auf pH 7,5 eingestellt und mit 1,8%iger NaCl-Lösung auf 10,0 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde anschließend im Mäusefalltest eingesetzt.

2.5 Mäusefalltest

Die Bestimmung der biologischen Aktivität erfolgte in dem von YOUNG und LEWIS [13] beschriebenen Mäusefalltest unter etwas veränderten Bedingungen.

Man setzte die Tiere 30 Stdn. vor Testbeginn nüchtern und führte den Test bei 30 °C aus.

Für jeden Wert wurde eine Gruppe von 10 Mäusen benutzt, denen man je nach Aktivität der zu prüfenden Verbindung 0,1 bis 0,3 ml der Testlösung i.p. gespritzt hatte. Die Mäuse wurden in schrägstehende, langsam rotierende Maschendrahtzylinder gesetzt. Zeigte die Testlösung blutzuckersenkende Wirkung, so konnten sich die Mäuse am Maschengitter nicht mehr halten und fielen aus den Zylindern. Mäuse, die innerhalb der ersten 8 Min. herausfielen, wurden in den Zylinder zurückgesetzt. Die Dauer des Versuches betrug 60 Min. vom Injektionszeitpunkt an gemessen.

Die Errechnung der Insulinwirkung erfolgte an Hand einer Eichkurve, die man durch Injektion verschiedener Konzentrationen aus nat. Rinderinsulin erhalten hatte. Die Zahl der gefallenen Mäuse pro Gruppe wurde gegen die Insulinmenge in einem Diagramm aufgetragen und daraus die Aktivität des Rekombinationsproduktes abgelesen. Als Bezugspunkt

für die Berechnung wählte man die Insulinmenge, die theoretisch aus der eingesetzten B-Kette entstehen konnte. (Tab. 5, S. 43)
Von dem zu untersuchenden Rekombinationsprodukt wurde zur Injektion jeweils eine solche Menge eingesetzt, daß ca. 4 bis 8 Mäuse pro Gruppe fielen. Jede synthetisierte B-Kette wurde mindestens zweimal an verschiedenen Tagen im Mäusefalltest untersucht.

2.6 Darstellung des Chlormethylharzes

Die Chloromethylierung des Polymeren erfolgte nach der von MERRIFIELD [14] angewandten Methode. Es wurden Harze mit folgendem Chlorgehalt zur Synthese eingesetzt: 4,2 %, 5,3 % und 7,1 %.

2.7 t-Butyloxycarbonyl-Alanin-Harz [14]

20 g des chlorierten Harzes wurden in 60 ml Äthanol/Essigester (1 : 1) mit 4,5 g t-BOC-Ala und 3,4 ml Triäthylamin 40 Stdn. bei 80 °C gerührt. Das Harz wurde dann abfiltriert, mehrmals mit einem Gemisch Äthanol/Essigester und zuletzt mit Methanol gewaschen und i. V. getrocknet. Die Bestimmung des Alaningehaltes am Harz erfolgte durch Aminosäureanalyse nach 24 Stdn.-Hydrolyse einer bestimmten Menge t-BOC-Ala-Harz in 6 N HCl bei 120 °C. Der Alaningehalt der verwendeten Harze betrug:
0,5 mMol Ala/g Harz, 0,45 mMol Ala/g Harz und 0,72 mMol Ala/g Harz.

2.8 Darstellung der geschützten und aktivierten Aminosäuren

Als Aminoschutzgruppe wurde ausschließlich der t-BOC-Rest verwendet.

2.8.1 t-BOC-azid [15]

300 g t-BOC-hydrazid wurden in 175 ml H_2O und 267 g Eisessig gelöst, auf 0 °C abgekühlt und unter kräftigem Rühren eine Lösung von 172,2 g $NaNO_2$ in 200 ml H_2O so zugetropft, daß sich die Temperatur des Reaktionsgemisches zwischen 4 °C und 10 °C hielt. Dann wurde noch eine halbe Std. im Eisbad und eine Std. bei Raumtemp. weitergerührt. Nach Zugabe von 300 ml H_2O wurde die organische Phase abgetrennt und die wäßrige Phase 4mal mit 150 ml Äther extrahiert. Ätherextrakte und organische Phase wurden vereinigt, 1mal mit 150 ml H_2O, 5mal mit 120 ml 1 N $NaHCO_3$-Lösung und 2mal mit 150 ml H_2O gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 und Abdestillieren des Äthers wurde mit Dioxan auf 500 ml aufgefüllt. Diese Lösung kam ohne weitere Reinigung bei der Darstellung der t-BOC-Aminosäuren zur Verwendung.

2.8.2 t-BOC-alanin [16, 34]

44,5 g (500 mMol) L-Alanin wurden in 100 ml H_2O, 100 ml Dioxan und 140 ml (550 mMol) einer 4 M t-BOC-azid-Lösung in Dioxan suspendiert und am Autotitrator bei pH 10,1 mit 4 N NaOH titriert. - Verbrauch 245 - 255 ml 4 N NaOH, Reaktionszeit 19 Stdn. - Die nun klare Lösung wurde bei 35 °C i. V. auf etwa 100 ml eingeengt, mit H_2O auf etwa 500 ml aufgefüllt und die Lösung 3mal mit 100 ml Äther extrahiert. Die wäßrige Phase brachte man bei 0 °C mit Citronensäure auf pH 2 - 3. Das zunächst ölig ausfallende t-BOC-ala wurde nach einiger Zeit fest. Das Reaktionsgemisch wurde in einem Scheidetrichter 4mal mit 200 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterextrakte wurden 6mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen,

dann über wasserfreiem $NaSO_4$ getrocknet und i. V. bei 35 °C eingedampft. Das zurückbleibende Öl löste man in 150 ml Äther und brachte das t-BOC-ala durch Zugabe von Petroläther zur Kristallisation.

Ausbeute: 77,5 g = 85 % d. Theorie MG: 189,22

$[\alpha]_{578}^{18-25^{\circ}}$ = - 12,5 (c = 1 Dioxan)

Fp.: 80 - 81 °C Fp. Lit.: 80 - 82 °C

2.8.3 t-BOC-phenylalanin [16, 34]

83,0 g (500 mMol) L-Phenylalanin wurden in 200 ml H_2O suspendiert, mit 100 ml Dioxan und 137,5 ml (220 mMol) 4 M t-BOC-azid-Lösung versetzt und bei Raumtemp. am Autotitrator bei pH 10,1 mit 4 N NaOH titriert. Verbrauch NaOH ca. 250 ml, Reaktionszeit ca. 14 Stdn. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer bis fast zur Trockne eingeengt, die gelbe kristalline Substanz in ca. 375 ml H_2O aufgelöst und 3mal mit 75 ml Äther extrahiert. Die wäßrige Lösung wurde in Eiswasser mit fester Citronensäure auf pH 2,5 - 3,0 eingestellt, dabei fiel ein Öl aus. Die Lösung wurde mit NaCl gesättigt, 5mal mit 125 ml Essigester ausgeschüttelt, die vereinigten Essigesterphasen 3mal mit 60 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, getrocknet und anschließend i. V. eingedampft. Umkristallisation erfolgte aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 130 g = 98 % d. Theorie MG: 265,3

$[\alpha]_{578}^{27,5}$ = - 4,6 (c = 1 Eisessig)

Lit. $[\alpha]_{578}^{18-25}$ = - 4,0 (c = 1 Eisessig)

Fp.: 87 °C Fp. Lit.: 84 - 86 °C

2.8.4 t-BOC-glycin [16]

37,6 g (500 mMol) Glycin wurden in 200 ml H_2O und 200 ml Dioxan suspendiert, 150 ml 4 N BOC-azid-Lösung zugegeben und mit 4 N NaOH bei pH 10,0 am Autotitrator titriert. Reaktionsdauer 6 - 8 Stdn. Es erfolgten dann Eindampfen des Reaktionsgemisches i. V., Lösen des Rückstandes in H_2O und 3malige Extraktion mit Äther. Die wäßrige Phase wurde mit Citronensäure auf pH 2 - 3 angesäuert und die dabei entstehende Stickstoffwasserstoffsäure i. V. abgezogen, das als Öl abgeschiedene t-BOC-glycin mit Essigester extrahiert, die vereinigten Essigesterphasen ca. 10mal mit gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt und anschließend über $MgSO_4$, dem Aktivkohle zugesetzt worden war, getrocknet. Dann wurde filtriert, i. V. bei 30 °C eingedampft und aus Essigester/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 70 g = 80 % d. Theorie MG: 175,1

Fp.: 94 - 95 °C

Fp. Lit.: 85 - 89 °C

2.8.5 N^{α}-t-BOC-N^{G}-tosyl-L-arginin wurde mir freundlicherweise von Herrn Dr. K. Eisele zur Verfügung gestellt.

2.8.6 L-Glutaminsäure-γ-benzylester [17]

Zu 500 ml Äther wurden unter Eiskühlung 50 ml konz. H_2SO_4 p.a. langsam zugetropft und wieder auf 0 °C abgekühlt. Dann wurden 500 ml dest. Benzylalkohol zugefügt und der Äther i. V. abgezogen. Danach wurden 73,5 g (0,5 Mol) L-Glutaminsäure in kleinen Portionen zugesetzt, das Gemisch 20 Stdn. gerührt und unter Eiskühlung

1 l 96%iges Äthanol und 250 ml dest. Pyridin zugegeben. Der L-Glutaminsäure-γ-benzylester kristallisierte spontan aus. Man beließ die Lösung noch ca. 20 Stdn. bei - 10 °C und saugte den ausgefallenen Ester schnell ab, wusch mit wenig kaltem Wasser nach und kristallisierte mehrmals aus kochendem Wasser um.

Ausbeute: 50 - 75 g = 40 - 64 % d. Theorie MG: 237,25

Fp.: 185 °C Fp. Lit.: 186 - 189 °C

2.8.7 t-BOC-L-glutaminsäure-γ-benzylester [34)]

500 mMol (118,5 g) L-Glutaminsäure-γ-benzylester wurden in 400 ml H_2O und 400 ml Dioxan suspendiert, 140 ml (550 mMol) einer 4 M t-BOC-azid-Lösung zugegeben und mit 4 N NaOH bei pH 9,5 titriert. Reaktionszeit 12 - 16 Stdn. Verbrauch NaOH 220 ml. Das Reaktionsprodukt wurde i. V. bei 30 °C auf ca. 200 ml eingeengt, evtl. ausfallendes Na-Salz durch Zugabe von H_2O wieder in Lösung gebracht und die wäßrige Lösung 3mal mit Äther extrahiert. Die wäßrige Phase brachte man unter Eiskühlung mit Citronensäure auf pH 2 - 3 und extrahierte das ausgefallene Öl mit Essigester. Die vereinigten Essigesterauszüge schüttelte man ca. 8mal mit gesättigter NaCl-Lösung aus und trocknete die Essigesterphase über $MgSO_4$, dem zur Entfärbung des Essigesters etwas Aktivkohle zugefügt worden war. Es wurde filtriert und das Filtrat i. V. bei 30 °C eingedampft. Das verbleibende klare Öl gelangte u. a. ohne weitere Reinigung zur Darstellung von t-BOC-L-glutaminsäure-γ-benzyl-α-p-nitrophenylester.

Ausbeute: 90 g = 54 % d. Theorie

2.8.8 S-Bzl-L-cystein [18]

60,5 g (500 mMol) L-Cystein wurden in einer Mischung aus 200 ml 2 N NaOH und 350 ml Äthanol gelöst. Unter Rühren tropfte man 69,5 ml (550 mMol) Benzylbromid zu. Das ausfallende S-Bzl-L-cystein rührte man noch eine Stunde. Umkristallisation erfolgte aus H_2O.

Ausbeute: 80 g = 75 % d. Theorie MG: 211,1

Fp.: 223 - 226 °C Fp. Lit.: 222 - 226 °C

2.8.9 t-BOC-S-bzl-L-cystein [16]

42,2 g (200 mMol) S-Bzl-L-cystein wurden in 100 ml Dioxan und 100 ml H_2O suspendiert, 56 ml (220 mMol) 4 M t-BOC-azid-Lösung zugegeben und mit 4 N NaOH bei pH 9,6 am Autotitrator titriert. Verbrauch 100 ml NaOH, Reaktionsdauer 14 Stdn. Das Reaktionsgemisch wurde i. V. eingedampft, mit ca. 250 ml H_2O aufgenommen, 3mal mit 100 ml Äther extrahiert und die wäßrige Phase mit Citronensäure bei 0 °C auf pH 2 - 3 angesäuert. Das t-BOC-S-bzl-L-cystein fiel als Öl an, das mit nicht umgesetztem S-Bzl-L-cystein verunreinigt war. Die wäßrige Phase mit dem ausgeschiedenen t-BOC-S-bzl-cys wurde mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterauszüge wurden mit gesättigter NaCl-Lösung neutral gewaschen, getrocknet und i. V. eingedampft. Umkristallisation erfolgte aus Äther/Petroläther.

Ausbeute: 50 g = 80 % d. Theorie MG: 311,2

Fp.: 63 - 65 °C

2.8.10 t-BOC-L-valin [16]

59 g (500 mMol) L-Valin wurden in 150 ml H_2O und 150 ml Dioxan suspendiert, 150 ml 4 N t-BOC-azid-Lösung zugesetzt und am pH-Stat

mit 4 N NaOH bei pH 9, 5 titriert. Reaktionsdauer 24 Stdn., Verbrauch NaOH 265 ml. Das Reaktionsgemisch wurde i. V. bei 30 °C weitgehend eingedampft, wieder in H_2O gelöst und 3mal mit Äther extrahiert. Die wäßrige Phase brachte man unter Kühlung mit fester Citronensäure auf pH 2 - 3, die dabei entstehende HN_3 wurde bei 0 °C i. V. abgezogen. Das t-BOC-val fiel beim Ansäuern als Öl an und wurde mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterauszüge wurden 8 - 10mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über $MgSO_4$ unter Zusatz von Aktivkohle getrocknet, filtriert und i. V. bei 20 - 30 °C eingedampft. Den Rückstand löste man in Äther, dampfte nochmals ein und kristallisierte schließlich aus Äther/Petroläther unter Zusatz von Impfkristallen um.

Ausbeute: 92 g = 84 % d. Theorie MG: 218, 37

$[\alpha]_{578}^{23}$ = - 6, 0 (c = 1 Eisessig)

$[\alpha]_{578}^{18-25}$ = - 5, 8 (c = 1 Eisessig)

Fp.: 74 °C Fp. Lit.: 77 - 79 °C

2.8.11 t-BOC-L-leucin 1/2 H_2O [16, 19, 34)]

66 g (500 mMol) L-Leucin suspendierte man in 150 ml H_2O und 150 ml Dioxan, stellte auf pH 9, 5 ein und versetzte mit 140 ml (550 mMol) 4 M t-BOC-azid-Lösung. Anschließend erfolgte Titration mit 4 N NaOH am pH-Stat bei pH 9, 5. Reaktionsdauer 26 Stdn., Verbrauch NaOH 270 ml. Dann wurde i. V. bei 30 °C eingeengt bis zur beginnenden Kristallisation des Na-Salzes. Der Rückstand wurde in H_2O aufgenommen und in eine gesättigte und gekühlte Citronensäurelösung eingerührt. Dabei fiel das t-BOC-leucin als Hemihydrat in Form farbloser Schuppen kristallin aus. Die gelbliche Wasserphase wurde nun abgesaugt und 3mal mit einem halben Liter eiskalten H_2O nachge-

waschen. Das kristalline Produkt trocknete man kurze Zeit über P_2O_5 und kristallisierte aus Tetrahydrofuran/Petroläther um.

Ausbeute: 101 g = 84 % d. Theorie MG: 240,3

$[\alpha]_{578}^{23}$ = - 26,5 (c = 1 Eisessig)

Lit. $[\alpha]_{578}^{18-25}$ = - 30,0 (c = 1 Eisessig)

Fp.: 77 - 81 °C Fp. Lit.: 78 - 81 °C

2.8.12 O-Benzyl-L-tyrosin [20]

144,8 g (800 mMol) L-Tyrosin wurden in 400 ml 2 N NaOH gelöst, 300 ml einer 30%igen $CuSO_4 \cdot 5H_2O$-Lösung zugefügt und 30 Min. bei 40 °C auf dem Wasserbad gerührt. Nach dem Abkühlen brachte man den ausgefallenen Kupferkomplex durch Zugabe von 3000 ml Methanol und 400 ml 2 N NaOH unter weiterem Rühren in Lösung und zentrifugierte von den nicht gelösten Anteilen ab. Dann wurden 100 ml Benzylbromid auf einmal zugefügt und das Gemisch bei 25 °C eine Stunde gerührt. Anschließend wurde ausgefallenes O-Bzl-L-tyrosin-kupfer abgesaugt und 5mal mit 1 l Methanol/H_2O (1 : 3,5) gewaschen. Dann wurde bei 60 °C getrocknet. Den erhaltenen Kupferkomplex zerstörte man durch 4maliges Verreiben mit jeweils einem halben Liter 1 N HCl. Nach sorgfältigem Waschen mit H_2O, verd. NH_3 und zuletzt mit Aceton/Äther wurde getrocknet und aus 80%iger Essigsäure umkristallisiert. Die Kristalle saugte man von der Mutterlauge ab und trocknete über NaOH.

Ausbeute: 75 g = 65 % d. Theorie MG: 271,23

$[\alpha]_D^{28}$ = - 9,9 (c = 1 80%ige Essigsäure)

$[\alpha]_D$ = - 9,9 (c = 1 80%ige Essigsäure)

Fp.: 221 °C Fp. Lit.: 223 °C

2.8.13 t-BOC-O-benzyl-L-tyrosin [16, 21]

68 g (250 mMol) O-Bzl-L-tyr wurden in 110 ml Dioxan und 110 ml H_2O suspendiert, der pH auf 9,5 eingestellt und 70 ml 4 M t-BOC-azid-Lösung zugegeben. Dann erfolgte Titration am pH-Stat unter starkem Rühren bei pH 10,4 mit 4 N NaOH. Reaktionsdauer 22 Stdn., Verbrauch NaOH 135 ml. Nach Abziehen des Dioxans am Rotationsverdampfer wurde 4mal mit 100 ml Äther ausgeschüttelt und die wäßrige Phase ohne Abkühlen auf pH 2,5 gebracht. Das freie t-BOC-O-bzl-tyr fiel als eine in festen Brocken erhärtende Masse aus. Die HN_3 wurde abgezogen und nach Absaugen der wäßrigen Lösung der feste Rückstand in Essigester gelöst. Dann saugte man vom ungelösten, nicht umgesetzten O-Bzl-tyr ab und schüttelte die Essigesterlösung nochmals mit Citronensäurelösung durch. Es wurde 6mal mit gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt, über $NaSO_4$ und Aktivkohle getrocknet, abfiltriert und nach Abziehen des Essigesters der ölige Rückstand aus Essigester/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 75 g = 81 % d. Theorie Lit. Ausbeute: 98 %

$[\alpha]_{578}^{23}$ = + 12,4 (c = 1 Aceton)

Lit. $[\alpha]_{578}^{18-25}$ = + 12,1

Fp.: 108 - 110 °C Fp. Lit.: 108 - 110 °C

MG: 371,4

2.8.14 und 2.8.15

N^{α}-t-BOC-N^{im}-bzl-L-histidin und t-BOC-O-benzyl-L-serin wurden mir freundlicherweise von Herrn Dr. U. Weber zur Verfügung gestellt.

2.8.16 t-BOC-L-glutamin [16]

73,1 g (500 mMol) L-Glutamin wurden in einem Gemisch von 200 ml H_2O und 200 ml Dioxan suspendiert, mit 150 ml 4 N t-BOC-azid-Lösung versetzt und bei pH 10,3 mit 4 N NaOH am pH-Stat titriert. Reaktionszeit 24 Stdn. Das Reaktionsgemisch rotierte man bis fast zur Trockne ein, löste wieder in H_2O und säuerte mit Citronensäure auf pH 2 - 3 an. Die Lösung wurde mit NaCl gesättigt, die wäßrige Phase 10mal mit 150 ml Essigester extrahiert, die vereinigten Essigesterauszüge mit wenig gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt, über $MgSO_4$ und Aktivkohle getrocknet, filtriert und einrotiert. Den Rückstand löste man durch Erwärmen in 250 ml Essigester, gab ein paar Impfkristalle zu und ließ bei 0 °C auskristallisieren.

Ausbeute: 72 g = 60 % d. Theorie MG: 246,3

$[\alpha]_{578}^{23}$ = - 2,9 (c = 1 Äthanol)

Lit. $[\alpha]_{578}^{18-25}$ = - 2,9

Fp.: 114 °C Fp. Lit.: 116 - 118 °C

2.8.17 t-BOC-L-glutamin-p-nitrophenylester [34]

49,3 g (200 mMol) t-BOC-L-glutamin und 30,6 g (220 mMol) p-Nitrophenol wurden in 150 ml THF gelöst, auf - 20 °C abgekühlt und langsam eine Lösung von 41,2 g DCCI in wenig THF zugegeben. Nach 5 Stdn. Rühren im Eis/NaCl-Bad ließ man über Nacht stehen, erwärmte vorsichtig auf 30 - 40 °C, um den mit dem Dicyclohexylharnstoff ausgefallenen Ester wieder in Lösung zu bringen, saugte vom Harnstoff ab und wusch diesen noch mehrmals mit etwas heißem THF. Filtrat und Waschflüssigkeiten wurden bei 20 °C einrotiert und der Rückstand aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 37 g = 50 % d. Theorie MG: 367, 4

Fp.: 144, 5 - 146 °C Fp. Lit.: 140 - 146 °C

2.8.18 t-BOC-L-asparagin [16, 34)]

75, 1 g (500 mMol) L-Asparagin • H_2O wurden fein zerrieben, in 150 ml H_2O und 125 ml Dioxan suspendiert, die Suspension auf pH 9, 0 eingestellt, mit 140 ml (550 mMol) 4 M BOC-azid-Lösung versetzt und unter kräftigem Rühren am pH-Stat mit 4 N NaOH bei pH 9, 8 titriert. Reaktionszeit 48 Stdn., Verbrauch NaOH 250 ml. Anschließend wurde das Dioxan am Rotationsverdampfer abgezogen, nach Zugabe von H_2O 3mal mit 100 ml Äther ausgeschüttelt, die wäßrige Phase im Eisbad gekühlt und mit Citronensäure auf pH 2, 5 gebracht. Das in fester Form ausgefallene t-BOC-L-asn wurde abgenutscht, 2mal in eiskaltem H_2O suspendiert und wieder trockengesaugt und schließlich aus Äthanol/H_2O (1 : 4) umkristallisiert. Das kristalline Produkt trocknete man i. V. über $CaCl_2$.

Ausbeute: 56 g = 48 % d. Theorie Lit. Ausbeute: 72 %

$[\alpha]_{578}^{22}$ = - 7, 4 (c = 1 DMF)

Lit. $[\alpha]_{578}^{18-25}$ = - 8, 5

Fp.: 173 - 174 °C Fp. Lit.: 174 - 178 °C

MG: 232, 3

2.8.19 t-BOC-L-asparagin-p-nitrophenylester [22, 34)]

56 g t-BOC-L-asparagin und 37, 6 g p-Nitrophenol wurden in 500 ml TH und 180 ml DMF gelöst, im Eisbad gekühlt, 54, 8 g DCCI in 100 ml THF zugegeben und unter Eiskühlung und Feuchtigkeitsausschluß 6 Stdn. ge-

rührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abgesaugt, mehrmals mit THF nachgewaschen und das THF bei 30 °C abrotiert. Die zurückbleibende DMF-Lösung filtrierte man nochmals, versetzte mit 500 ml Essigester und schüttelte 5mal mit verdünnter $NaHCO_3$-Lösung aus. Dann wurde 3mal mit H_2O, 1mal mit 10%iger Citronensäurelösung und 2mal mit H_2O ausgeschüttelt, über Na_2SO_4 getrocknet, der Essigester abgezogen und der feste Rückstand 2mal aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 26,8 g = 31,5 % d. Theorie Lit.Ausbeute: 52 %

$[\alpha]_D^{22}$ = - 37,8 (c = 1 DMF)

Lit. $[\alpha]_D^{22}$ = - 45,3

Fp.: 153 - 154 °C Fp. Lit.: 157 - 158 °C

2.8.20 t-BOC-O-benzyl-L-tyrosin-p-nitrophenylester [23]

3,7 g (10 mMol) t-BOC-O-bzl-L-tyr und 1,53 g (11 mMol) p-Nitrophenol wurden in 12,5 ml THF gelöst, die Lösung in einem Eis-NaCl-Bad abgekühlt, mit 1,22 g (10,25 mMol) DCCI versetzt und bis zur Auflösung des DCCI geschüttelt. Die Lösung wurde ca. 5 Stdn. bei - 15 °C, 16 Stdn. bei ca. 3 °C und 6 Stdn. bei Raumtemperatur belassen. Man filtrierte den ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, rotierte das Filtrat ein, nahm den Rückstand in wenig THF auf, dampfte nochmals ein und trocknete den Rückstand dann über P_2O_5 und NaOH. Die Umkristallisation erfolgte aus THF/Petroläther.

Ausbeute: 4,4 g = 89,5 % d. Theorie Lit.Ausbeute: 93 %

Fp.: 140 - 141,5 °C Fp.Lit.: 145 - 146 °C

MG: 492,52

2.8.21 bis 2.8.26

Die p-Nitrophenylester von t-BOC-L-alanin, t-BOC-S-bzl-L-cystein, t-BOC-L-glycin, t-BOC-L-glutaminsäure-γ-benzylester, t-BOC-L-leucin und t-BOC-L-phenylalanin wurden alle nach demselben Verfahren hergestellt [24, 34, 35].

100 mMol der t-BOC-aminosäure und 120 mMol p-Nitrophenol wurden in 150 ml Essigester gelöst und auf 0 °C abgekühlt (t-BOC-L-glutaminsäure-γ-benzylester auf - 10 °C). Dann löste man 110 mMol DCCI in wenig Essigester und fügte diesen unter Rühren zu der zuerst bereiteten Lösung. 2 Stdn. wurde bei 0 °C und 2 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Man filtrierte den ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab und dampfte nach Auswaschen mit Essigester Filtrat und Waschflüssigkeiten i. V. ein. Die Umkristallisation des Rückstandes erfolgte aus Äthanol oder Äthanol/Petroläther.

	Ausbeute	Fp.
t-BOC-alanin-p-nitrophenylester	65 %	81 - 82 °C
t-BOC-S-bzl-cystein-pNP	78 %	94,5 - 95,5 °C
t-BOC-glycin-pNP	85 %	68 °C
t-BOC-glutaminsäure-γ-bzl-α-pNP	77 %	118 - 119 °C
t-BOC-leucin-pNP	57 %	90 - 91,5 °C
t-BOC-phenylalanin-pNP	82 %	127 - 128 °C

2.9 Synthese der geschützten B-Ketten nach der Merrifield-Methode mit DCCI als Kupplungsreagenz [25, 26]

Eine bestimmte Menge t-BOC-ala-Harz wurde mit einer der Kettenlänge entsprechenden Anzahl geschützter Aminosäuren nacheinander in einer Spezialapparatur umgesetzt. Dabei wurde nach dem Reaktionszyklus der folgenden Tabelle verfahren.

Tabelle 1: Schema zur Merrifield-Synthese

Merrifield-Harz

Chlormethyliertes Merrifield-Harz

t-BOC-ala-Harz

1. 1 N HCl/Eisessig schütteln - 30 Min.
2. 3mal waschen mit Eisessig
3. 3mal waschen mit Äthanol
4. 3mal waschen mit DMF
5. 10 % Triäthylamin in DMF schütteln - 15 Min.
6. 3mal waschen mit DMF
7. 3mal waschen mit CH_2Cl_2
8. mit 4 - 10facher molarer Menge der t-BOC-aminosäure in ca. 1 M Lösung in CH_2Cl_2 10 Min. schütteln
9. Zugabe äquivalenter Menge DCCI - 2 M Lösung in CH_2Cl_2 - schütteln 2 Stdn.
10. 3mal waschen mit CH_2Cl_2
11. 3mal waschen mit Äthanol
12. 3mal waschen mit Eisessig

Bei der Synthese wurden nachstehend aufgeführte geschützte Aminosäuren eingesetzt:

t-BOC-alanin, t-BOC-O-bzl-tyrosin, t-BOC-phenylalanin, t-BOC-glycin, t-BOC-N^G-tosyl-arginin, t-BOC-glutaminsäure-γ-benzylester, t-BOC-S-bzl-cystein, t-BOC-valin, t-BOC-leucin, t-BOC-N^{im}-bzl-histidin, t-BOC-O-bzl-serin, t-BOC-asparagin-pNP und t-BOC-glutamin-pNP.

Da bei der Kupplungsreaktion mit DCCI die Amidgruppen von Asparagin und Glutamin zu Nitrilen dehydratisiert werden und als solche den weiteren Syntheseverlauf stören können, wurden diese Aminosäuren als aktivierte Ester gekuppelt.

2.10 Synthese der geschützten B-Ketten nach der Merrifield-Methode unter Verwendung von t-BOC-aminosäure-p-nitrophenylestern [27, 28]

Die Synthese der B-Ketten nach dieser Methode erfolgte weitgehend nach dem von S. HÖRNLE [28] bei der Synthese der Rinderinsulin-A-Kette angewandten Verfahren.
Auch hier gilt das Schema von Tabelle 1, S. 23. Die Schritte 7., 8. und 9. wurden ausgelassen. Bei Nr. 8 setzte man eine 4 - 10fach molare Menge des t-BOC-aminosäure-p-nitrophenylesters ein. Es wurde 48 Stdn. geschüttelt und anschließend unter Nr. 10 3mal mit DMF ausgewaschen.

2.11 Abspaltung der synthetischen B-Kette vom Harz

Zur Abspaltung der B-Kette vom Träger wurde das Peptid-Harz je nach Größe des Ansatzes in 30 - 50 ml Trifluoressigsäure suspendiert und 55 Min. ein HBr-Strom durch die Suspension geleitet. Die Trifluoressigsäure wurde abgesaugt, das verbleibende Harz noch 4mal mit 5 ml TFA ausgeschüttelt und die Auszüge mit der ersten TFA vereinigt. Dann wurde die TFA am Rotationsverdampfer bei Raumtemp. abgezogen, der Rückstand zum restlosen Entfernen von HBr noch 4mal mit 10 ml TFA aufgenommen und wieder einrotiert. Der Rückstand wurde in möglichst wenig TFA gelöst und Äther zugesetzt. Das Peptid fiel als weißer Niederschlag aus. Den Niederschlag zentrifugierte man

ab, der überstehende Äther wurde verworfen. Das Aufwirbeln in Äther und Abzentrifugieren wurde solange wiederholt, bis der überstehende Äther keine saure Reaktion mehr zeigte. Anschließend erfolgte Trocknen der B-Kette über NaOH und P_2O_5.

Bei dieser Abspaltung der B-Kette vom Träger mit HBr/TFA werden folgende Schutzgruppen von Seitenkettenfunktionen abgelöst:
-γ-Bzl von Glu-γ-Bzl, -O-Bzl von O-Bzl-Tyr und O-Bzl-Ser und der t-BOC-Rest der zuletzt ankondensierten Aminosäure.
Geschützt lagen noch vor Arg als N^G-Tos-Arg, Cys als S-Bzl-Cys und His als N^{im}-Bzl-His.

2.12 Abspaltung der S-Bzl-, N^G-Tos- und N^{im}-Bzl-Reste mit Natrium in flüssigem Ammoniak

Die Abspaltung des Tosyl- und Benzylrestes wurde nach dem in der Literatur angegebenen Verfahren mit Natrium in flüssigem Ammoniak durchgeführt [29, 30, 31]. Als Reaktionsgefäß diente die Spezialapparatur nach HÖRNLE [32].

Bis zu 400 mg der jeweiligen N^G-Tos-, S-Bzl- und N^{im}-Bzl-B-Kette wurden in über Natrium destilliertem Ammoniak gelöst und soviel einer Lösung von Na in flüssigem NH_3 zugegeben, bis die blaue Farbe für 50 sec. bestehen blieb. Durch Zugabe von etwas NH_4Cl entfärbte man die Lösung und dampfte das NH_3 i. V. ab. Als Rückstand erhielt man die reduzierte B-Kette.

2.13 Sulfitolyse der reduzierten B-Kette

Die reduzierte B-Kette nahm man in ca. 30 ml eiskaltem H_2O bidest. auf, stellte auf pH 9,2 ein und versetzte mit 50 ml Tris-Puffer pH 9,2,

1 g Na_2SO_3 und 500 mg $Na_2S_4O_6$. Die Lösung wurde 3 Stdn. bei 37 °C belassen, dann 12 Stdn. dialysiert, filtriert und lyophilisiert. Die auf diese Weise erhaltenen $BSSO_3^-$-Ketten wurden entweder ungereinigt oder gereinigt mit natürlicher $ASSO_3^-$-Kette rekombiniert und im Mäusefalltest auf ihre biologische Aktivität geprüft. (Beschreibung von Rekombination und Mäusefalltest s. o. 2.4 und 2.5.)

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Über die Bedeutung von Tyrosin B 16, Leucin B 6, B 11, B 15 und B 17 sowie Valin B 12 und B 18 für die biologische Aktivität des Insulins war bisher nichts bekannt. Nachstehend wird über den Austausch dieser Aminosäuren gegen L-Alanin und den Einfluß der Sequenzvariation auf den Wirkungsgrad des Insulins berichtet.

Die Größe der Ansätze, die Ausbeuten, Aminosäureanalysen und Aktivitäten im Mäusefalltest der synthetisierten B-Ketten können den Tabellen 2, 3, 4 und 5 entnommen werden.

3.1 Austausch von Tyrosin B 16 gegen Alanin (Kette Nr. 3)

K. EISELE [2, 35] zeigte, daß durch Weglassen der letzten drei Aminosäuren der B-Kette und Austausch von Thr B 27 und Ser B 9 gegen Alanin ein B-Kettenprodukt entsteht, das im Mäusefalltest eine erheblich höhere Aktivität aufweist als früher synthetisierte B-Ketten mit gleichem Austausch, jedoch vollständiger Kettenlänge [2, 33]. Deswegen wurden in der vorliegenden Arbeit nur B-Ketten synthetisiert, bei denen das carboxyl-endständige Tripeptid Pro-Lys-Ala (B 28 - 30) weggelassen und das nun endständige Thr B 27 durch Ala ersetzt ist.
Um eine Vergleichskette für B-Ketten mit ausgetauschten Leucinresten zu haben, wurde nach der pNP-Methode eine verkürzte B-Kette synthetisiert, in der Tyr B 16 und Ser B 9 durch Ala ausgetauscht waren. Die geschützten pNP-Aminosäuren wurden in 4fach molarer Menge eingesetzt und das Reaktionsgemisch 48 Stdn. geschüttelt.

Die Kette zeigte im Mäusefalltest eine Aktivität von 6, 4 % und bestätigte damit auch die Befunde von EISELE und ZOLLNER [2, 33, 35]. Die vergleichsweise höhere Aktivität scheint durch den günstigeren Syntheseverlauf bei der verkürzten Kette zustande zu kommen.

3.2 Gemeinsamer Austausch von Leucin B 15 und Leucin B 17 gegen Alanin (Kette Nr. 4)

Durch die Synthese einer [Ala^{9}, Ala^{15}, Ala^{16}, Ala^{17}, Ala^{27}]-B-Kette wurde untersucht, ob nicht beide das Tyr B 16 flankierenden Leucinreste für die Wirkung des Insulins unbedeutend sind. Beim Aufbau der Kette wurde nach der pNP-Methode verfahren. Im biologischen Test zeigte dieses B-Kettenprodukt nach Kombination mit A-Kette nur eine geringe Restaktivität von 0, 3 %. Das Tyr B 16 konnte für den Wirkungsverlust nicht verantwortlich gemacht werden (siehe Kette Nr. 3).

Mindestens eines der beiden Leucinmoleküle ist also für die Wirkung essentiell. Die Synthese der beiden folgenden Ketten galt der Aufklärung der Frage, ob wenigstens einer der beiden Leucinreste B 15 oder B 17 ohne Aktivitätsverlust ausgetauscht werden kann.

3.3 Austausch von Leucin B 17 bzw. Leucin B 15 gegen Alanin in zwei verschiedenen B-Ketten (Ketten Nr. 5 und 6)

Nach der pNP-Methode wurde eine [Ala^{9}, Ala^{16}, Ala^{17}, Ala^{27}]-B-Kette aufgebaut. Die geschützten Aminosäuren wurden in 4fach molarer Menge eingesetzt. Die Kette erbrachte im Mäusefalltest eine Aktivität von 6, 6 %.

Mit diesem und dem vorhergehenden Befund (Kette Nr. 4) konnte schon gesagt werden, daß Leu B 17 nicht, Leu B 15 aber essentiell ist. Um diesen Befund zu sichern, wurde nach der gleichen Methode eine [Ala^{9}, Ala^{15}, Ala^{16}, Ala^{27}]-B-Kette hergestellt. Der Mäusefalltest ergab hier nur eine Aktivität von 0,6 % und bewies damit, daß Leu B 15 essentiell ist.

Die oben genannten Befunde ließen vermuten, daß auch die beiden, den Histidinresten B 5 und B 10 benachbarten Leucinmoleküle B 6 und B 11 Bedeutung für die Aktivität besitzen könnten. Die B-Ketten, die der Untersuchung dieses Problemes galten, wurden nach der DCCI-Methode aufgebaut. Diese Methode hat gegenüber dem Einsatz aktivierter Ester den Vorteil, daß ein Reaktionszyklus nur ca. 4 Stdn. dauert. Als Bezugskette diente eine B-Kette, in der das Ser B 9 nicht ausgetauscht war.

3.4 Synthese einer [Ala^{16}, Ala^{27}]-B-Kette (Kette Nr. 2)

Das für diese Synthese verwendete Serin wurde als t-BOC-O-bzl-ser wie die übrigen Aminosäuren in 10fach molarer Menge, bezogen auf das Alanin am Harz, eingesetzt [34]. Durch diesen hohen Überschuß sollte eine bessere Kupplungsrate, besonders für His B 5 und B 10, erreicht werden. Die Werte für His und Asp lagen bei der Aminosäureanalyse auch etwas höher als bei Ketten, die mit 4fach molarer Menge hergestellt worden waren (Tabelle 3, S. 40). Der Wert für Phe lag dafür aber niedriger. Den sehr geringen Wert für Ser kann man wahrscheinlich auf eine Schädigung bei der Hydrolyse oder der

Behandlung der geschützten Kette mit Natrium in flüssigem Ammoniak zurückführen.

Im Mäusefalltest brachte diese Kette mit 6,1 % Aktivität keine Steigerung im Vergleich mit den B-Ketten, deren Serinrest durch Ala ersetzt worden war (Ketten Nr. 3 und 5).

3.5 Synthese einer [Ala^{9}, Ala^{16}, Ala^{27}]-B-Kette (Kette Nr. 7)

Um zu überprüfen, ob sich bei Aufbau einer B-Kette nach der DCCI-Methode Ausbeute und Wirkung mit einer nach der pNP-Methode synthetisierten Kette vergleichen lassen, wurde die B-Kette (Nr. 3) nach dem erstgenannten Verfahren nochmals hergestellt.

Es zeigte sich, daß die biologische Aktivität mit 4,1 % ca. 30 % unter der Aktivität von Kette Nr. 3 lag. Dieser Wert bewegte sich jedoch noch innerhalb der Standardabweichung vom Mittelwert (Tab. 5, S. 43), so daß sich daraus kein Schluß auf die Qualität der Methode ziehen ließ. Die Ausbeute lag aber mit 43 % unter dem Wert der Vergleichskette (Nr. 3), wo die Ausbeute 54 % betragen hatte (Tab. 2, S. 39).

3.6 Austausch von Leucin B 11 bzw. Leucin B 6 gegen Alanin in zwei verschiedenen Ketten (Ketten Nr. 8 und 9)

Eine [Ala^{9}, Ala^{11}, Ala^{16}, Ala^{27}]-B-Kette (Nr. 8) zeigte im Mäusefalltest eine Restaktivität von 0,6 %. Daraus ließ sich schließen, daß Leu B 11 essentiell ist.

Wurde Leu B 6 durch Ala ersetzt (Nr. 9), so sank auch bei dieser [Ala^{6}, Ala^{9}, Ala^{16}, Ala^{27}]-B-Kette die Insulinwirkung des Rekombina-

tionsproduktes mit natürlicher Rinderinsulin-A-Kette auf eine Restaktivität von 0,2 % ab. Leucin B 6 und B 11 sind demnach für die Wirkung des Insulins wichtig und müssen beide zusammen im B-Kettenmolekül vorhanden sein.

Bei der Synthese der zuletzt aufgeführten Kette wurden die zu kuppelnden Aminosäuren in 10fach molarer Menge eingesetzt. Die Histidin- und Asparaginwerte der Aminosäureanalyse lagen hier wie bei Kette Nr. 2 (s. o.) etwas höher als bei Nr. 3, dafür war aber der Wert für Phe wesentlich geringer.

Wie EISELE [35] durch Verkürzung der Insulin-B-Kette am Carboxyl- und Aminoende zeigen konnte, brauchen sich schlechte Kupplungsraten am Aminoende der B-Kette bis zu einem gewissen Grad nicht aktivitätsmindernd im biologischen Test auszuwirken.

Die folgenden Untersuchungen galten den Valinresten der B-Kette. Daß Val B 2 für die Wirkung des Insulins unerheblich ist, war schon mit einer nach der Merrifield-Methode aufgebauten [Des-Phe^{1}, des-Val^{2}-Ala^{4}]-B-Kette bewiesen worden [1, 2]. Die zwei restlichen, jeweils einem Leu benachbarten Valinmoleküle B 12 und B 18 wurden in der vorliegenden Arbeit durch Austausch gegen Alanin untersucht. Diese B-Ketten wurden nach der pNP-Methode synthetisiert.

3.7 Austausch von Valin B 12 und B 18 gegen Alanin (Kette Nr. 12)

Eine [Ala^{9}, Ala^{12}, Ala^{16}, Ala^{18}, Ala^{27}]-B-Kette, in der also sowohl Val B 12 als auch Val B 18 gegen Ala ausgetauscht waren, verlor

fast alle Wirkung, wie die Aktivität von 0, 1 % im Mäusefalltest zeigte. Bei einer Standardabweichung von 150 % läßt sich in diesem Fall auch nicht mehr von einer Restaktivität sprechen.

3.8 Austausch von Valin B 12 bzw. Valin B 18 gegen Alanin in zwei verschiedenen B-Ketten (Ketten Nr. 10 und 11)

Die zuerst ausgeführte [Ala^{9}, Ala^{12}, Ala^{16}, Ala^{27}]-B-Kette (Nr. 10) ergab mit 0, 3 % Aktivität im Mäusefalltest, daß Val B 12 für die Wirkung des Insulins erforderlich ist. Ersetzte man Val B 18 durch Alanin, so sank die Aktivität der [Ala^{9}, Ala^{16}, Ala^{18}, Ala^{27}]-B-Kette (Nr. 11) auf 2, 1 %, was ca. einem Drittel der Wirkung einer Vergleichskette (Nr. 3) entsprach.

Anhand der drei zuletzt beschriebenen B-Ketten und Zwischenanalysen verschiedener anderer noch geschützter B-Kettenteilstücke (Nr. 2, 7, 15) ließ sich gut demonstrieren, daß mit zunehmender Kettenlänge die Kupplungsrate schlechter wird und vermehrte Stumpfbildung auftritt. Auffallend bei den meisten Aminosäureanalysen der synthetischen $BSSO_3$-Ketten waren die zu niedrigen Werte für Asp, Val, Glu und Phe. Bei Kette Nr. 12 war als einziger Valinrest noch der in Position B 2 vorhanden und zeigte in der Aminosäureanalyse nur ca. 50 % des theoretischen Wertes (Tabelle 3 und 4). Sind die Valinreste B 12 und B 18 vorhanden, so wird der schlechte Wert von Val B 2 durch die beiden anderen kompensiert.

Ähnliches kann für die Werte von Phe, Glu und auch His B 5 angenommen werden, denn die Aminosäureanalyse eines B-Kettenfragmentes

B 7 - B 27 (Nr. 2) ergab für die drei vorhandenen Leucinreste einen fast theoretischen Wert und gute Werte für Gly und Cys (Tabelle 4, S. 42). Daraus darf man schließen, daß die schlechten Kupplungsraten erst bei His B 5 beginnen und daß bei der Ausbeute einer synthetischen B-Kette vollständiger Länge nur ca. 50 % erwartet werden dürfen, wenn nicht wesentlich bessere Kupplungsraten erzielt werden können.

Eine Erklärung für den essentiellen Charakter von Leu B 15, B 11 und B 6 sowie der Valinreste B 12 und B 18 könnten die Ergebnisse der Röntgenstrukturaufklärung des kristallinen Insulins durch die Arbeitsgruppe von D. C. HODGKIN et al. [42] sein. Auf Grund von Elektronendichtemessungen an Insulinkristallen wurde von dieser Arbeitsgruppe ein Modell des Insulindimeren und Insulinhexameren entwikkelt.

Dieses Modell zeigt die A-Kette als kompakte Einheit, um die sich die B-Kette windet. Die Bereiche B 1 - B 6 und B 21 - B 30 erweisen sich hier ziemlich weit auseinandergezogen, während der innere Teil der B-Kette drei Schleifen einer α-Helix zeigt. Außerdem stehen die B-Kettenstücke B 1 - B 5 und B 28 - B 30 aus dem als abgeplatteten Sphäroid dargestellten Insulinhexameren heraus.

Leu B 6 befindet sich als erstes Molekül innerhalb des Kerns dieses Sphäroids. Leu B 11 und B 15, Val B 12 und auch Val B 18 liegen an exponierter Stelle des α-Helixbereiches und könnten mit Hilfe ihrer aliphatischen Seitenketten durch van der Waal' sche Kräfte an der Konsolidierung der Konformation beteiligt sein.

Die Annahme der Autoren von l.c. [42], daß wahrscheinlich nur die im Zentrum des Sphäroids liegenden Aminosäuren für die Wirkung essentiell sind, während die herausragenden Kettenstücke für die Wirkung von untergeordneter Bedeutung sind, stimmt mit den Ergebnissen der durch EISELE [2, 35] vorgenommenen Kürzungen der B-Kette überein. Eine Ausnahme scheint hier der Histidinrest B 5 zu bilden.

3.9 Austausch von Histidin B 5 und B 10 sowie von Arginin B 22 gegen Alanin

3.9.1 Synthese einer [Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{27}]-B-Kette und einer [Ala^{5}, Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{27}]-B-Kette (Ketten Nr. 13 und 14)

Die Tatsache, daß Histidin auf Grund seiner Fähigkeit zur Säure-Base-Katalyse, zur Bildung energiereicher Acyl- und Phosphorylderivate, seines Komplexbildungsvermögens und seiner Neigung zur Bildung von Wasserstoffbindungen in den aktiven Zentren vieler Enzyme eine katalytische Funktion ausübt [36, 37], führte zur Untersuchung der beiden Histidinreste B 5 und B 10 des Insulins. Obwohl es bis jetzt nicht gelang, im Insulin ein aktives Zentrum unter Beteiligung des Histidins zu lokalisieren, konnte man durch verschiedene Untersuchungsverfahren, die sich allerdings auf Zerstörung oder Modifikation der Histidinmoleküle B 5 und B 10 beschränkten, einiges über die Bedeutung des Histidins für die Insulinwirkung aussagen.
Mit Hilfe der Photooxidation [38, 39] gelang es, die Imidazolringe der Histidinreste im intakten Insulin ohne gravierende Schädigung anderer Aminosäuren zu zerstören. In Abhängigkeit vom Zerstörungs-

grad konnte ein biologischer Wirkungsverlust des Insulins festgestellt werden.

Eine andere Arbeitsgruppe erreichte eine Modifikation der Histidinreste am intakten Insulin durch Cyanoäthylierung [40]. Auch diese Methode gestattete festzustellen, daß die Histidinmoleküle für die biologische Aktivität des Insulins wichtig sind. Für His B 5 wurde eine besondere Bedeutung vermutet. Die Autoren dieser Arbeit gaben auf Grund ihrer Untersuchungen für die Rolle von His B 5 zwei mögliche Erklärungen. Einmal könnte His B 5 Bedeutung für die Konformation des Insulinmoleküles haben und zum anderen könnte es Teil eines für die biologische Wirkung verantwortlichen Kettenabschnittes sein. Durch die mit der Histidinblockierung gleichzeitig und teilweise erfolgende Blockierung von α- und ε-Aminogruppen ließ sich jedoch kein eindeutiger Schluß über den Zusammenhang zwischen Gehalt an His B 5 und biologischer Wirkung des Insulins ziehen.

Ein exaktes Verfahren zur Überprüfung der Rolle, die His B 5 und His B 10 für die biologische Aktivität spielen, bot hier wieder der Austausch dieser Moleküle durch Alanin (siehe auch l. c. [41]).

Austausch von Histidin B 10 gegen Alanin (Kette Nr. 13)

Nach der DCCI-Methode wurde eine [Ala^9, Ala^{10}, Ala^{27}]-B-Kette aufgebaut. Die geschützten Aminosäuren wurden hier in 4fach molarer Menge eingesetzt. Diese B-Kette brachte im Mäusefalltest eine Aktivität von 5, 1 %.

Gegenüber einer Vergleichskette (Nr. 7), die 4, 1 % Aktivität gezeigt hatte, führte dieser Austausch zu keinem Wirkungsverlust. Histidin B 10 ist demnach nicht essentiell für die Insulinwirkung.

Austausch von Histidin B 5 und B 10 gegen Alanin (Kette Nr. 14)

Ebenfalls nach der DCCI-Methode wurde eine [Ala^5, Ala^9, Ala^{10}, Ala^{27}]-B-Kette synthetisiert und im Mäusefalltest auf ihre biologische Aktivität untersucht. Mit 2,9 % betrug die Aktivität unter Berücksichtigung der Standardabweichung ca. 50 % der Wirkung einer entsprechenden Vergleichskette, die vollen Histidingehalt hatte (Ketten Nr. 3 und 7).

Für das Absinken der Aktivität um die Hälfte konnte bei dieser Kette nur das His B 5 verantwortlich gemacht werden, da Kette Nr. 13 gezeigt hatte, daß Austausch von His B 10 gegen Ala zu keiner Aktivitätsminderung führt. Auch der Austausch von Ser B 9 gegen Ala konnte die Aktivitätsminderung nicht bewirkt haben, da sich dieser als stumme Substitution erwiesen hatte.

Aus diesen Ergebnissen darf man schließen, daß auch His B 5 nicht unbedingt für die Insulinwirkung notwendig ist; der Aktivitätsminderung entsprechend könnte man es als "halbessentiell" bezeichnen.

Die Aminosäuresequenzaufklärung von 25 verschiedenen Speziesinsulinen hat gezeigt, daß nicht alle diese Insuline Histidinreste in B 5 und B 10 tragen [40].

Diese Erscheinung und die oben aufgeführten Befunde lassen vermuten, daß die Histidinreste im Insulin nicht Bestandteile eines aktiven Zentrums sind, sondern bei der Schaffung optimaler Konformationsverhältnisse mitwirken.

3.9.2 Austausch von Arginin B 22 gegen Alanin (Ketten Nr. 15 und 16)

Ob die Guanidogruppe des Arginins für die Insulin-B-Kette eine besondere Bedeutung besitzt, ist noch ungeklärt.

ERLANDER fand 1960 in Enzymversuchen, daß die Guanidogruppe des Arginins unter bestimmten physiologischen Bedingungen, in diesem Fall der Acetylierung der Guanidogruppe, ähnliche Eigenschaften wie das Histidin besitzt [43]. Anhand eines Modelles demonstrierte er die Möglichkeit einer Acetylierung durch Asparaginsäure und wies darauf hin, daß einem Argininrest bei bestimmten enzymkatalysierten Reaktionen eine ähnliche Rolle zukommen könnte wie dem Histidin. Beweise für diese Hypothese wurden bis jetzt noch nicht erbracht.

Verschiedene in den letzten Jahren auf Grund unterschiedlicher Untersuchungsmethoden konstruierte Insulinmodelle zeigen alle Arginin B 22 und Asparagin A 21 in einer Lage, die erlaubt, daß sich zwischen Carboxylgruppe des Asn und Guanidogruppe des Arg eine Wasserstoffbrückenbindung ausbilden kann [42, 44, 45].

Besonders ARQUILLA [44] weist darauf hin, daß durch Fehlen von Asn A 1 Konformationsänderungen im Insulinmolekül stattfinden, die ein weitgehendes Absinken der biologischen Aktivität zur Folge haben.

Wenn man eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Arg B 22 und Asn A 21 annimmt, müßte beim Austausch von Arg gegen eine Aminosäure, die die Ausbildung dieser Bindung nicht erlaubt, die biologische Aktivität absinken.

Nach dem DCCI-Verfahren wurde eine [Ala^{9}, Ala^{22}, Ala^{27}]-B-Kette (Nr. 16) aufgebaut, es war also Arg B 22 durch Ala ersetzt worden.

Um eine möglichst hohe Umsatzrate bei jedem Kupplungsschritt zu erzielen, wurden die geschützten Aminosäuren in 10fach molarer Menge eingesetzt. Das Rekombinationsprodukt dieser B-Kette mit natürlicher Rinderinsulin-A-Kette ergab im Mäusefalltest eine Aktivität von 0,3 %. Eine unter gleichen Bedingungen synthetisierte [Ala^{9}, Ala^{27}]-B-Kette (Nr. 15) brachte eine Aktivität von 3,8 %.

Der signifikante Abfall der biologischen Aktivität der argininfreien im Vergleich zu der argininhaltigen B-Kette zeigte deutlich, daß der Argininrest in der B-Kette eine wichtige Rolle spielt.
Die Möglichkeit, daß die argininfreie B-Kette bei der Rekombination mit der A-Kette nicht mehr kuppelt, wurde durch Isolierung und Aminosäureanalyse des Rekombinationsproduktes ausgeschaltet (siehe 4.3, S. 48).

3.10 Rekombination von natürlicher Rinderinsulin-A-Kette mit natürlicher Rinderinsulin-B-Kette

Um einen Bezugspunkt für die Aktivitäten der Rekombinationsprodukte aus synthetischer B-Kette und natürlicher A-Kette zu haben, wurden mehrere Rekombinationen von nat. Rinderinsulin-A-Kette mit nat. Rinderinsulin-B-Kette durchgeführt. Die beiden nat. Ketten waren zuvor sorgfältig gereinigt worden. Es wurden bei diesen Rekombinationsprodukten im Mäusefalltest Werte zwischen 41 und 82,5 % Aktivität erhalten (Tab. 6, S. 44).

Tabelle 2: Ausbeuten in mg und %, Größe der Ansätze

Nr. d. B-Kette	S-Bzl-Kette bez. auf Ala-Harz		SSO_3^--Kette bez. auf S-Bzl-Kette		SSO_3^--Kette bez. auf Ala-Harz	Größe d. Ansatzes in mMol	Beladung d. Harzes in mMol
	mg	%	mg	%	%		
2	610	62	235	39	26	0,25	0,72
3	1070	54	610	57	30	0,50	0,50
4	930	49	485	52	27	0,50	0,50
5	1090	56	498	46	28	0,50	0,50
6	908	46	463	51	26	0,50	0,50
7	420	43	235	54	25	0,25	0,45
8	505	52	293	58	31	0,25	0,45
9	510	52	284	56	32	0,25	0,72
10	695	53	404	58	30	0,33	0,45
11	615	47	412	67	30	0,33	0,45
12	720	55	435	61	37	0,33	0,45
13	2270	60	1180	52	33	1,0	0,45
14	2310	62	1170	51	33	1,0	0,45
15	630	62	295	47	32	0,25	0,72
16	2180	57	955	44	26	1,0	0,72

Tabelle 3: Aminosäureanalysen der S-Sulfonat- und S-Bzl-B-Ketten

Nr. d. Kette	2			3			4			5		
AS	ber	S-Bzl	SSO_3^-	ber	S-Bzl	SSO_3^-	ber	S-Bzl	SSO_3^-	ber	S-Bzl	SSO_3^-
Asp	1	0,74	0,65	1	0,43	0,50	1	0,53	0,48	1	0,52	0,51
Ser	1	0,30	0,33	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glu	3	2,85	2,90	3	2,70	3,04	3	3,08	2,60	3	2,75	2,85
Gly	3	3,16	3,10	3	3,32	3,42	3	3,13	3,40	3	3,30	3,36
Ala	3	3,30	3,28	4	4,02	4,48	6	5,87	6,48	5	5,30	5,34
Val	3	2,70	2,76	3	2,38	2,60	3	2,74	3,10	3	2,3	2,65
Leu	4	3,95	3,80	4	3,76	4,00	2	1,61	1,70	3	2,58	2,78
Tyr	1	1,07	0,72	1	1,18	1,14	1	1,31	0,97	1	1,10	0,83
Phe	3	3,26	2,30	3	3,35	3,35	3	3,34	2,58	3	3,40	2,75
His	2	-	1,45	2	-	1,30	2	-	1,41	2	-	1,43
Arg	1	1,20	1,08	1	1,28	1,31	1	1,18	1,32	1	1,28	1,24

Tabelle 3: Fortsetzung

Nr. d. Kette	6			7			8			9		
AS	ber	S-Bzl	SSO_3^-	ber	S-Bzl	SSO_3^-	ber	S-Bzl	SSO_3^-	ber	S-Bzl	SSO_3^-
Asp	1	0,65	0,65	1	0,41	0,30	1	0,54	0,52	1	0,73	0,54
Ser	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glu	3	3,00	2,70	3	3,00	2,72	3	2,80	2,93	3	2,68	2,84
Gly	3	3,51	3,20	3	3,50	3,28	3	3,38	3,34	3	3,32	3,16
Ala	5	5,53	5,15	4	4,63	4,48	5	5,18	5,55	5	5,30	4,75
Val	3	2,04	2,50	3	2,58	2,55	3	2,42	2,60	3	2,90	2,88
Leu	3	2,60	2,80	4	3,95	3,81	3	2,76	2,80	3	3,25	3,41
Tyr	1	1,20	0,81	1	1,25	0,94	1	1,12	0,82	1	1,15	0,71
Phe	3	3,48	2,31	3	3,65	2,99	3	3,41	3,05	3	3,27	1,98
His	2	-	1,35	2	-	1,08	2	-	1,28	2	-	1,40
Arg	1	1,18	0,96	1	1,46	1,42	1	1,25	1,12	1	1,15	1,04

Tabelle 3: Fortsetzung

Nr. d. Kette	10			11			12			13		
AS	ber	S-Bzl	SSO_3^-	ber	S-Bzl	SSO_3^-	ber	S-Bzl	SSO_3^-	ber	S-Bzl	SSO_3^-
Asp	1	0,57	0,52	1	0,56	0,53	1	0,58	0,52	1	0,68	0,70
Ser	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glu	3	2,72	2,78	3	3,00	3,10	3	2,80	2,94	3	2,82	3,00
Gly	3	3,28	3,22	3	3,43	3,36	3	3,20	3,42	3	3,18	3,50
Ala	5	5,10	5,45	5	5,11	5,56	6	6,85	6,82	4	3,99	4,28
Val	2	1,45	1,50	2	1,98	1,70	1	0,55	0,52	3	2,50	2,84
Leu	4	4,37	4,17	4	4,02	4,00	4	4,00	4,00	4	3,60	3,77
Tyr	1	1,07	0,95	1	1,08	0,97	1	0,98	0,92	2	1,72	1,85
Phe	3	3,30	2,92	3	3,10	3,02	3	3,41	3,38	3	3,25	2,75
His	2	-	1,52	2	-	1,40	2	-	1,82	1	-	0,73
Arg	1	1,25	1,15	1	-	1,21	1	1,22	1,28	1	0,98	0,96

Tabelle 3: Fortsetzung

Nr. d. Kette	14			15			16		
AS	ber	S-Bzl	SSO_3^-	ber	S-Bzl	SSO_3^-	ber	S-Bzl	SSO_3^-
Asp	1	0,69	0,67	1	0,48	0,49	1	0,75	0,62
Ser	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glu	3	2,80	3,00	3	2,6	3,00	3	2,78	3,00
Gly	3	3,38	3,36	3	3,48	3,40	3	3,24	3,20
Ala	5	5,00	5,00	3	3,40	3,29	4	4,55	4,25
Val	3	2,40	2,66	3	2,60	3,20	3	2,90	2,78
Leu	4	3,80	3,82	4	3,92	4,40	4	3,84	3,86
Tyr	2	1,70	1,74	2	1,95	1,98	2	2,14	1,65
Phe	3	3,22	2,60	3	3,20	3,26	3	3,35	2,55
His	0	0	0	2	-	1,48	2	-	1,60
Arg	1	1,05	1,25	1	1,32	1,23	0	0	0

Cystein wurde nicht bestimmt.

Tabelle 4: Zwischenanalysen von S-Bzl-B-Kettenfragmenten

Nr. d. Kette	2		7		15	
AS	Ala^{27} - Cys^{7}		Ala^{27} - Val^{12}		Ala^{27} - Leu^{17}	
	ber	S-Bzl	ber	S-Bzl	ber	S-Bzl
Asp	0	0	0	0	0	0
Ser	1	0,33	0	0	0	0
Glu	2	2,00	2	2,00	1	1,00
Gly	3	3,11	2	2,12	2	2,06
Ala	2	2,42	3	3,05	1	1,22
Val	2	2,01	2	1,79	1	0,98
Leu	3	3,06	2	1,85	1	1,34
Tyr	1	1,03	1	0,92	1	1,09
Phe	2	2,45	2	2,43	2	2,38
His	0	0	0	0	0	0
Arg	1	1,35	1	1,12	1	1,02
Cys	2	1,81	-	-	-	-

Tabelle 5: Biologische Aktivität der Hybridinsuline im Mäusefalltest

Nr. d. Kette	Synthetische B-Kette	Aktivitäten im Mäusefalltest [%] Mittelwert	Standardabweichung S	[% vom Mittelwert]	Zahl d. Mäuse
2	[Ala^{16}, Ala^{27}]-B-Kette	6, 1	± 1, 12	± 18	110
3	[Ala^{9}, Ala^{16}, Ala^{27}]-B-Kette	6, 4	± 2, 18	± 34	120
4	[Ala^{9}, Ala^{15}, Ala^{16}, Ala^{17}, Ala^{27}]-B-Kette	0, 3	± 0, 15	± 46	60
5	[Ala^{9}, Ala^{16}, Ala^{17}, Ala^{27}]-B-Kette	6, 6	± 1, 45	± 22	70
6	[Ala^{9}, Ala^{15}, Ala^{16}, Ala^{27}]-B-Kette	0, 6	± 0, 22	± 37	80
7	[Ala^{9}, Ala^{16}, Ala^{27}]-B-Kette	4, 1	± 1, 45	± 35	80
8	[Ala^{9}, Ala^{11}, Ala^{16}, Ala^{27}]-B-Kette	0, 6	± 0, 28	± 48	80
9	[Ala^{6}, Ala^{9}, Ala^{16}, Ala^{27}]-B-Kette	0, 2	± 0, 04	± 23	80
10	[Ala^{9}, Ala^{12}, Ala^{16}, Ala^{27}]-B-Kette	0, 3	± 0, 15	± 50	120
11	[Ala^{9}, Ala^{16}, Ala^{18}, Ala^{27}]-B-Kette	2, 1	± 0, 73	± 35	160
12	[Ala^{9}, Ala^{12}, Ala^{16}, Ala^{18}, Ala^{27}]-B-Kette	0, 1	± 0, 15	± 150	110
13	[Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{27}]-B-Kette	5, 1	± 2, 26	± 44	230
14	[Ala^{5}, Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{27}]-B-Kette	2, 9	± 1, 45	± 50	140
15	[Ala^{9}, Ala^{27}]-B-Kette	3, 8	± 1, 5	± 39	130
16	[Ala^{9}, Ala^{22}, Ala^{27}]-B-Kette	0, 3	± 0, 27	± 83	150

Tabelle 6: Biologische Aktivität der Rekombinationsprodukte von nat. Rinder-$ASSO_3^-$-Kette mit nat. Rinder-$BSSO_3^-$-Kette

Nr.	Rekombinationsbestandteile	Mittelwert [%]	Standardabweichung vom Mittelwert S	[%]	Z M
I	nat. $ASSO_3^-$-Kette gereinigt, 10 mg nat. $BSSO_3^-$-Kette gereinigt, 2,5 mg	82,5	± 4,3	± 5,1	80
II	nat. $ASSO_3^-$-Kette gereinigt, 20 mg nat. $BSSO_3^-$-Kette gereinigt, 5,0 mg	42,5	± 4,4	± 9,8	80
III	nat. $ASSO_3^-$-Kette gereinigt, 20 mg nat. $BSSO_3^-$-Kette gereinigt, 5,0 mg	64,0	± 21	± 30	80
IV	nat. $ASSO_3^-$-Kette gereinigt, 10 mg nat. $BSSO_3^-$-Kette gereinigt, 2,5 mg	41,0	± 14,4	± 35	80

Tabelle 7: Biologische Aktivität der gereinigten nat. $ASSO_3^-$-Kette nach Rekombination mit sich selbst
(Untersuchung auf Verunreinigung durch nat. $BSSO_3^-$-Kette)

Nr.	Rekombinationsbestandteile	Verunreinigung durch B-Kette [%]	Zahl d. Mäuse
I	nat. $ASSO_3^-$-Kette gereinigt	0,06	60
II	nat. $ASSO_3^-$-Kette gereinigt	0,04	100
III	nat. $ASSO_3^-$-Kette gereinigt	0,01	60

4. REINIGUNG DER SYNTHETISCHEN $BSSO_3^-$-KETTEN

Die zum Teil unbefriedigenden Aminosäureanalysen und Ausbeuten der synthetischen B-Ketten beruhen auf der Bildung von Fehlsequenzen und Stümpfen während der Synthese [46, 47]. Dieser Nachteil der Merrifield-Methode wirkt sich bei langen Peptidketten wie z. B. der Insulin-B-Kette stärker aus als bei kürzeren Peptiden bis zu einer Länge von ca. 20 Aminosäureresten [47].

Außerdem ist mit der Bildung von Nebenprodukten bei der Natriumreduktion zu rechnen. Da jede synthetisierte B-Kette eine Peptidfamilie darstellt - in der vorliegenden Arbeit Peptide mit 2 - 27 Aminosäureresten - ist die Reinigung über Molekularsiebe wie Sephadex kaum möglich. Die synthetisierten B-Ketten Nr. 2 bis Nr. 16 besitzen mit His B 5 und His B 10 und Arg B 22 im sauren Bereich mehr positiv als negativ geladene Gruppen und wurden deshalb über einen sauren Ionenaustauscher gereinigt. Dabei wurde weitgehend nach einem Verfahren gearbeitet, das OKUDA und ZAHN [48] zur Reinigung der synthetischen Rinder-$BSSO_3^-$-Kette und der synthetischen Human-$BSSO_3^-$-Kette des Insulins verwendet hatten.

4.1 Reinigung der [Ala^9, Ala^{16}, Ala^{27}]-B-Kette (Nr. 3) durch Ionenaustauschchromatographie an Dowex 50 WX 2

100 bis 200 mg $BSSO_3^-$-Kette wurden in Citratpuffer von pH 2, 2 in 8 M Harnstoff weitgehend gelöst. Vom ungelösten Anteil, der aus noch geschützter B-Kette bestand, wurde abzentrifugiert und die Lösung auf die mit Dowex 50 WX 2 (1 x 25 cm) gefüllte Säule aufgetragen. Die

Säule war zuvor mit einem Citratpuffer vom pH 3, 0 in 8 M Harnstoff äquilibriert worden. Nach dem Auftragen wurde mit jeweils 50 ml der folgenden Puffer stufenweise eluiert:

pH 3, 0 - Citratpuffer 0, 2 N Na^+ in 8 M Harnstoff

pH 4, 3 - Citratpuffer 0, 2 N Na^+ in 8 M Harnstoff

pH 5, 1 - Acetatpuffer 0, 35 N Na^+ in 8 M Harnstoff

pH 7, 0 - Acetatpuffer 0, 35 N Na^+ in 8 M Harnstoff

pH 9, 0 - Acetatpuffer 0, 35 N Na^+ in 8 M Harnstoff

Die UV-Absorption wurde mit einem Uvicordgerät (LKB-8300 Uvicord II) bei einer Wellenlänge von 278 nm gemessen. Es wurden vier Fraktionen aufgefangen (Abb. 2, S. 50).

Jede Fraktion wurde vier Stunden dialysiert und dann gefriergetrocknet. Anschließend wurde in 1 N Essigsäure gelöst, zur vollständigen Entsalzung an einer Säule von Sephadex G 25 fine mit 1 N Essigsäure eluiert und wieder gefriergetrocknet. Die einzelnen Fraktionen wurden nach Rekombination mit nat. $ASSO_3^-$-Kette im Mäusefalltest auf ihre biologische Aktivität untersucht. Fraktion I zeigte ca. 3 % Aktivität und Fraktion II 17, 2 % Aktivität, alle übrigen Fraktionen waren ohne Wirkung (Tab. 8, S. 53). Im Elektropherogramm hatte die bei pH 5, 1 eluierte Fraktion II eine ähnliche Laufgeschwindigkeit wie eine zum Vergleich aufgetragene nat. $BSSO_3^-$-Kette (Abb. 7, S. 52). Auch die in der Aminosäureanalyse erhaltenen Werte deuteten darauf hin, daß es sich bei Fraktion II um das gewünschte synthetische B-Kettenprodukt handelte (siehe Tab. 9, S. 54). Die Ausbeute betrug 15 %, bezogen auf die zur Reinigung eingesetzte $BSSO_3^-$-Kette.

4.2 Reinigung der [Ala^{9}, Ala^{16}, Ala^{17}, Ala^{27}]-B-Kette (Nr. 5) und anschließende Reinigung des Hybridinsulins

200 mg der $BSSO_3^-$-Kette (Nr. 5) wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren über Dowex 50 WX 2 gereinigt (Abb. 3, S. 50). Die bei pH 5,1 eluierte Fraktion III erwies sich nach Aminosäureanalyse und Mäusefalltest mit einer Aktivität von 20,6 % als das gewünschte B-Kettenprodukt (Tab. 8 und 9). Die Ausbeute an gereinigter $BSSO_3^-$-Kette betrug ca. 10 %.

Da auch bei der Rekombination der synthetischen $BSSO_3^-$-Ketten mit nat. $ASSO_3^-$-Kette Nebenprodukte wie z. B. B-Kettenpolymerisate entstehen, die keine Insulinaktivität besitzen, wurde das durch Rekombination mit nat. $ASSO_3^-$-Kette erhaltene Hybridinsulin gereinigt. Hierbei wurde nach einer von K.H. HERZOG [34] ausgearbeiteten Methode verfahren.

15 mg über Dowex 50 WX 2 gereinigte $BSSO_3^-$-Kette (Nr. 5) wurden in Anteilen von 5 mg mit jeweils 20 mg nat. $ASSO_3^-$-Kette rekombiniert. Jedem Ansatz wurde eine Probe entnommen und an 20 Mäusen auf das Gelingen der Rekombination untersucht.

Die Rekombinationslösungen wurden vereinigt mit 1 N HCl auf pH 7 - 7,5 eingestellt und nach Zugabe von ein paar Tropfen Octanol auf ca. 10 ml einrotiert. Nach Versetzen mit 5 - 6 g Harnstoff brachte man unter Kühlung mit Eisessig auf pH 2,2, zentrifugierte das ausgefallene Protein ab und wusch den Niederschlag mehrmals mit 1 N Essigsäure in 8 M Harnstoff. Die vereinigten Harnstofflösungen dia-

lysierte man 5 Stdn. gegen 0,5 M Essigsäure. Das bei der Dialyse ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert, der Niederschlag mit 1 N Essigsäure mehrmals ausgewaschen und die vereinigten Essigsäurelösungen im Vakuum unter Zugabe von Octanol auf das Auftragsvolumen von ca. 5 ml einrotiert. Die Lösung wurde auf eine mit Sephadex G 50 superfine (1,8 x 125 cm) gefüllte Säule aufgetragen und mit 1 N Essigsäure eluiert. Es ließen sich drei Fraktionen isolieren (Abb. 6, S. 52). Fraktion P II erwies sich als das gewünschte Hybridinsulin. Die Ausbeute von 8 mg entsprach 30 % der Theorie, bezogen auf die Menge Hybridinsulin, die sich maximal aus 15 mg $BSSO_3^-$-Kette bei der Rekombination bilden konnte. Das Hybridinsulin brachte im Mäusefalltest 39,3 % Aktivität. Damit war durch die Reinigung eine 6fache Steigerung der biologischen Wirkung, bezogen auf eine Primäraktivität von 6,6 %, erzielt worden.

Zur Kontrolle wurden von den Fraktionen P I, P II und P III noch Aminosäureanalysen durchgeführt. Hier bestätigten sich die Ergebnisse des Mäusefalltestes, denn Fraktion P II ergab sehr gute Werte in der Analyse (Tab. 10, S. 55). Fraktion P III bestand fast nur aus A-Kette.

4.3 Reinigung der [Ala^9, Ala^{22}, Ala^{27}]-B-Kette (Kette Nr. 16)

200 mg $BSSO_3^-$-Kette (Nr. 16) wurden, wie schon beschrieben, über Dowex 50 WX 2 gereinigt. Das gewünschte B-Kettenprodukt wurde auch hier bei pH 5,1 eluiert (siehe F III, Abb. 4, S. 51 und Tab. 9, S. 54). Die Ausbeute an gereinigtem Produkt betrug 8 %, bezogen

auf die zur Reinigung eingesetzte $BSSO_3^-$-Kette. 15 mg dieses Produktes wurden nach Rekombination mit nat. $ASSO_3^-$-Kette als Hybridinsulin nach der Methode von HERZOG gereinigt (s. o.). Bei der Elution über Sephadex G 50 superfine konnten drei Fraktionen isoliert werden. Aus dem Verhältnis der Aminosäuren von A-Kette zu B-Kette konnte man nach Aminosäureanalyse schließen, daß Fraktion P II das gewünschte Hybridinsulin war (Abb. 5, S. 51 und Tab. 10, S. 55) und daß auch die argininfreie B-Kette bei der Rekombination mit nat. A-Kette gekuppelt hatte. Die über Dowex 50 WX 2 gereinigte Kette und das gereinigte Hybridinsulin erbrachten im Mäusefalltest Aktivitäten von 0, 3 bzw. 0, 4 %. Eine nennenswerte Steigerung der biologischen Wirkung war also nicht eingetreten (Tab. 8, S. 53). Dies entsprach den schon erwähnten Befunden, daß nach Austausch von Arg B 22 durch Alanin die B-Kette ihre biologische Wirkung weitgehend verliert. Die Möglichkeit einer nicht zustandegekommenen Kupplung bei der Rekombination von argininfreier B-Kette mit nat. $ASSO_3^-$-Kette wird durch die oben beschriebene Reinigung und durch die Aminosäureanalyse des Hybridinsulins widerlegt (siehe Tab. 10, S. 55).

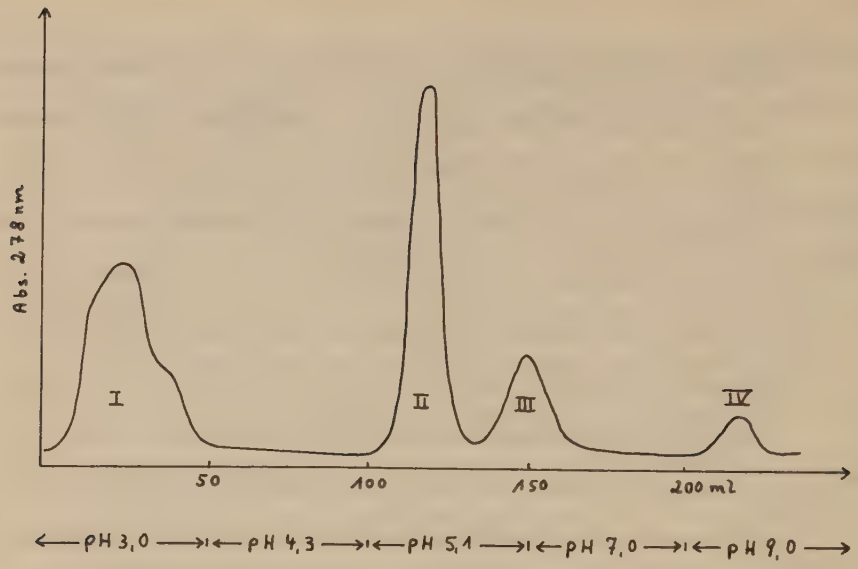


Abb. 2: Chromatogramm der [Ala^{9}, Ala^{16}, Ala^{27}]-Bunte-Salz-B-Kette an Dowex 50 WX 2

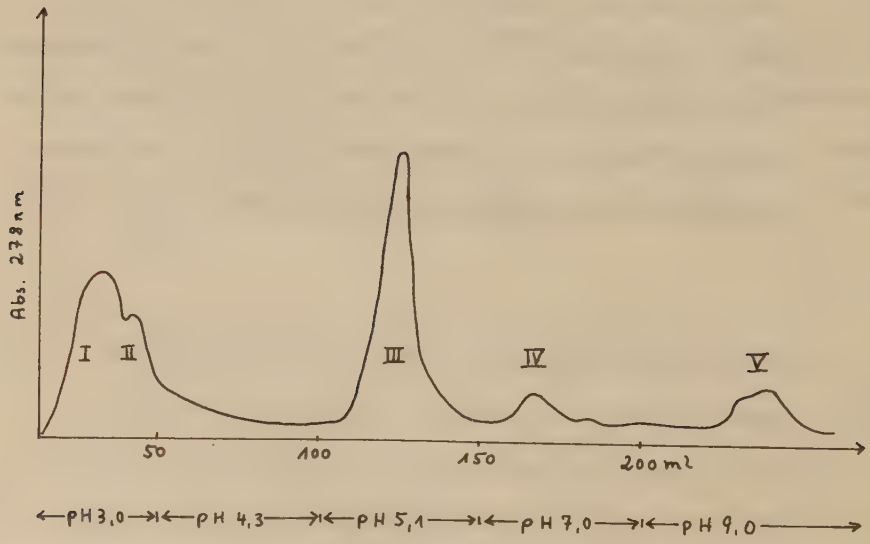


Abb. 3: Chromatogramm der [Ala^{9}, Ala^{16}, Ala^{17}, Ala^{27}]-Bunte-Salz-B-Kette an Dowex 50 WX 2

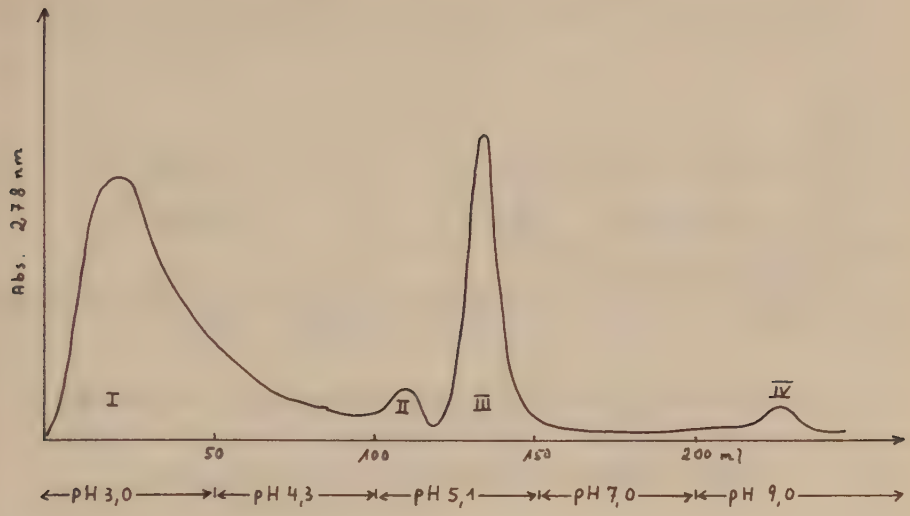


Abb. 4: Chromatogramm der [Ala^{9}, Ala^{22}, Ala^{27}]-Bunte-Salz-B-Kette an Dowex 50 WX 2

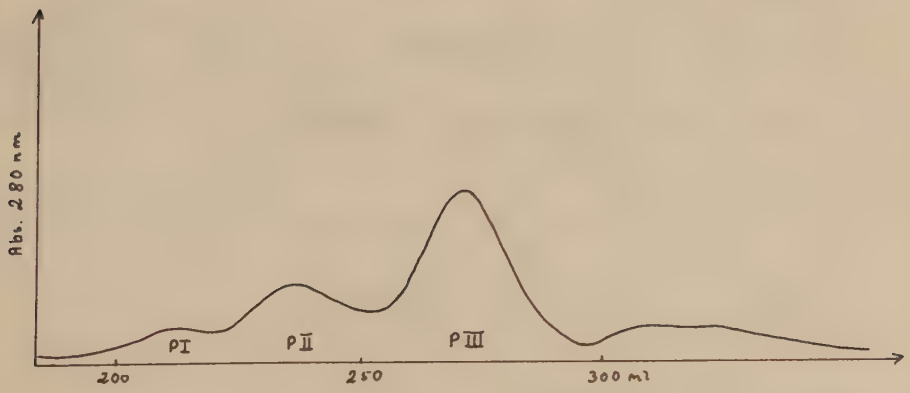


Abb. 5: Chromatogramm des Rekombinationsproduktes von gereinigter [Ala^{9}, Ala^{22}, Ala^{27}]-Bunte-Salz-B-Kette mit natürlicher Rinder-Bunte-Salz-A-Kette an Sephadex G 50 superfine

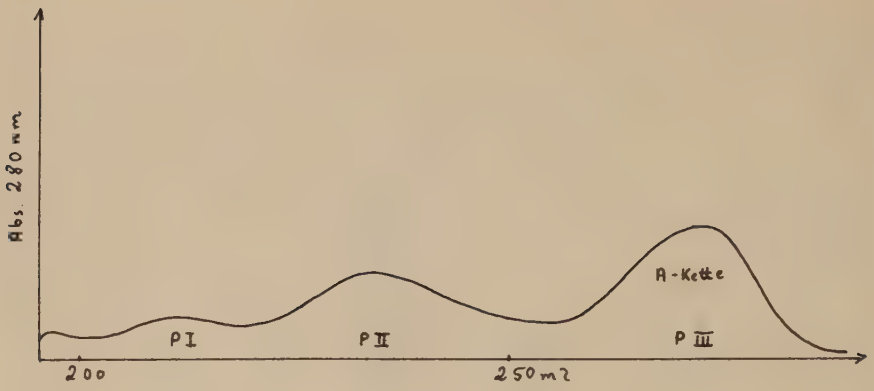
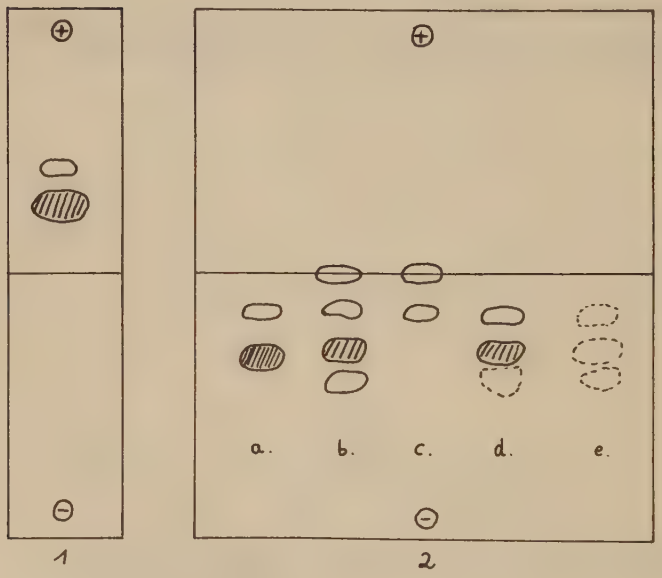


Abb. 6: Chromatogramm des Rekombinationsproduktes von gereinigter [Ala^{9}, Ala^{16}, Ala^{17}, Ala^{27}]-Bunte-Salz-B-Kette mit natürlicher Rinder-Bunte-Salz-A-Kette an Sephadex G 50 superfine



Spannung: 200 V

Laufzeit: 2 Stdn.

Puffer:

10 % Essigsäure
15 % Ameisensäure
4 M Harnstoff

Abb. 7: Elektropherogramme

1. Gereinigte nat. Bunte-Salz-A-Kette aus Rinderinsulin
2. a) Gereinigte nat. Bunte-Salz-B-Kette aus Rinderinsulin
   b) Ungereinigte [Ala^{9}, Ala^{16}, Ala^{27}]-Bunte-Salz-B-Kette
   c) Fraktion I
   d) Fraktion II
   e) Fraktion III

Tabelle 8: Biologische Aktivität der gereinigten synthetischen $BSSO_3^-$-Ketten und des gereinigten Hybridinsulins

Nr. d. Kette	Synthetische B-Kette	Aktivitäten im Mäusefalltest [%] Mittelw.	Standardabweichung S	[%] vom Mittelw.	Zahl d. Mäuse
3	[Ala^9, Ala^{16}, Ala^{27}]-B-Kette ungereinigt	6,4	± 2,18	± 34	120
3	[Ala^9, Ala^{16}, Ala^{27}]-B-Kette gereinigt F II	17,2	± 3,6	± 21	80
5	[Ala^9, Ala^{16}, Ala^{17}, Ala^{27}]-B-Kette ungereinigt	6,6	± 1,45	± 22	70
5	[Ala^9, Ala^{16}, Ala^{17}, Ala^{27}]-B-Kette gereinigt F III	20,6	± 2,75	± 13,5	90
5	[Ala^9, Ala^{16}, Ala^{17}, Ala^{27}]-B-Kette gereinigt F II	19,0	± 4,7	± 25	50
5	Hybridinsulin gereinigt	39,3	± 7,7	± 20	90
6	[Ala^9, Ala^{22}, Ala^{27}]-B-Kette gereinigt F III	0,3	± 0,082	± 23	50
6	Hybridinsulin gereinigt	0,4	± 0,09	± 24	60

Tabelle 9: Aminosäureanalysen der gereinigten S-Sulfonat-B-Ketten

Nr. d. Kette		3				5			
AS	ber	unger.	ger. F I	ger. F II	ber	unger.	ger. F I	ger. F II	ger. F III
Asp	1	0,50	0,15	0,76	1	0,51	0,49	0,24	0,95
Ser	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glu	3	3,04	2,36	3,00	3	2,85	2,60	2,62	3,00
Gly	3	3,42	3,00	3,03	3	3,36	3,00	3,00	3,02
Ala	4	4,48	3,72	4,02	5	5,34	5,12	5,30	5,20
Val	3	2,60	1,95	2,85	3	2,65	2,20	2,50	2,95
Leu	4	4,00	3,90	4,21	3	2,78	2,52	3,00	2,98
Tyr	1	1,14	0,68	0,75	1	0,83	0,74	0,81	0,84
Phe	3	3,35	1,55	2,42	3	2,75	1,92	1,88	2,60
His	2	1,30	0,85	1,95	2	1,43	0,81	1,65	2,10
Arg	1	1,31	1,02	1,09	1	1,30	1,08	1,07	1,01

Tabelle 9: Fortsetzung

Nr. d. Kette		16			
AS	ber	unger.	ger. F I	ger. F II	ger. F III
Asp	1	0,62	0,36	1,15	0,95
Ser	0	0	0	0	0
Glu	3	3,00	3,00	2,22	3,00
Gly	3	3,30	3,81	2,90	3,12
Ala	4	4,25	4,23	3,85	4,23
Val	3	2,78	3,40	3,28	2,79
Leu	4	3,86	3,59	4,10	3,58
Tyr	2	1,65	1,56	0,65	1,64
Phe	3	2,55	0,95	1,60	2,96
His	2	1,60	1,32	1,80	1,85
Arg	0	0	0	0	0

Tabelle 10: Aminosäureanalysen der gereinigten Hybridinsuline

Nr. d. Kette		5			16	
AS	ber	P I	P II	ber	P I	P II
Asp	3	3, 38	2, 97	3	3, 00	3, 35
Ser	2	1, 26	0, 81	2	1, 53	1, 25
Glu	7	6, 55	7, 05	7	5, 95	7, 25
Gly	4	3, 82	4, 02	4	4, 16	3, 32
Ala	6	4, 95	6, 00	5	3, 43	4, 11
Cys	6	5, 26	4, 07	6	4, 22	4, 61
Val	5	4, 92	5, 00	5	4, 40	4, 93
Ile	1	1, 31	1, 00	1	1, 42	1, 18
Leu	5	5, 00	5, 00	6	4, 95	5, 65
Tyr	3	2, 91	2, 68	4	2, 53	3, 19
Phe	3	1, 79	2, 52	3	0, 92	2, 22
His	2	2, 01	2, 00	2	1, 75	1, 88
Arg	1	1, 00	1, 00	0	0	0

5. ZUSAMMENFASSUNG

Beschrieben wird die Darstellung am C-terminalen Ende verkürzter Insulin-B-Ketten (B 1 - B 27) variierter Sequenz. Die Peptidsynthese erfolgte am festen Träger nach der Methode von MERRIFIELD.
Die Ankondensation der t-Butyloxycarbonyl-Aminosäuren erfolgte teilweise mit Dicyclohexylcarbodiimid als Kupplungsreagenz und zum Teil wurden die geschützten Aminosäuren als p-Nitrophenylester eingesetzt.
Fünfzehn Varianten der B-Kette des Rinderinsulins wurden dargestellt und nach Rekombination mit nat. Rinderinsulin-A-Kette im Mäusefalltest auf ihre biologische Wirksamkeit untersucht.
Es wurde versucht, aus dem Grad der Aktivität nach Austausch der Aminosäuren Leucin, Valin, Histidin und Arginin in der B-Kette des Insulins auf den konformationsbestimmenden Charakter dieser Aminosäuren zu schließen.

Aktivität im Mäusefalltest zeigten: [Ala^{16}, Ala^{27}]-B-Kette, [Ala^{9}, Ala^{16}, Ala^{27}]-B-Kette, [Ala^{9}, Ala^{16}, Ala^{17}, Ala^{27}]-B-Kette, [Ala^{9}, Ala^{16}, Ala^{18}, Ala^{27}]-B-Kette, [Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{27}]-B-Kette, [Ala^{5}, Ala^{9}, Ala^{10}, Ala^{27}]-B-Kette und [Ala^{9}, Ala^{27}]-B-Kette.

Die folgenden B-Ketten hatten nur eine Restaktivität oder erwiesen sich als unwirksam: [Ala^{9}, Ala^{15}, Ala^{16}, Ala^{17}, Ala^{27}]-B-Kette, [Ala^{9}, Ala^{15}, Ala^{16}, Ala^{27}]-B-Kette, [Ala^{9}, Ala^{11}, Ala^{16}, Ala^{27}]-B-Kette, [Ala^{6}, Ala^{9}, Ala^{16}, Ala^{27}]-B-Kette, [Ala^{9}, Ala^{12}, Ala^{16}, Ala^{27}]-B-Kette, [Ala^{9}, Ala^{12}, Ala^{16}, Ala^{18}, Ala^{27}]-B-Kette und [Ala^{9}, Ala^{22}, Ala^{27}]-B-Kette.

Daraus ergab sich für die Struktur-Wirkungsbeziehung in der B-Kette des Insulins, daß die aliphatischen Aminosäuren Leu B 6, Leu B 11, Leu B 15 und Val B 12 und die basische Aminosäure Arg B 22 essentiell sind. Für Val B 18 und His B 5, die bei Austausch gegen Alanin einen teilweisen Abfall der biologischen Aktivität bewirken, muß ein "halbessentieller" Charakter angenommen werden.

Durch die Reinigung von zwei synthetischen B-Ketten konnte die Primäraktivität um ca. das Dreifache erhöht werden. Von einer gereinigten B-Kette wurde auch noch das Hybridinsulin gereinigt und dadurch die biologische Wirkung nochmals um das Doppelte erhöht. Damit wurde eine Aktivität von ca. 40 % erzielt, bezogen auf krist. Rinderinsulin = 100 %.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1) V. Mitteilung: U. Weber und G. Weitzel
Hoppe-Seyler's Z. physiolog. Chem. 349, 1431 (1968)

2) VII. Mitteilung: G. Weitzel, K. Eisele, H. Zollner und U. Weber
Hoppe-Seyler's Z. physiolog. Chem. 350, 1480 (1969)

3) R.B. Merrifield
J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149 (1963)

4) R.B. Merrifield
J. Amer. Chem. Soc. 86, 304 (1964)

5) R.B. Merrifield
Biochemistry 3, 1385 (1964)

6) R.B. Merrifield
J. Org. Chem. 29, 3100 (1964)

7) A. Marglin und R.B. Merrifield
J. Amer. Chem. Soc. 88, 5051 (1966)

8) B. Gutte und R.B. Merrifield
J. Amer. Chem. Soc. 91, 501 (1969)

9) Y.-c. Du, Y.-s. Shang, Z.-x. Lu und C.-l. Tsou
Scientia sinica (Peking) 10, 84 (1961) und 15, 231 (1966)

10) Gmelin-Kraut II, 1, 341

11) P.G. Katsoyannis, A. Tometsko und C. Zalut
J. Amer. Chem. Soc. 89, 4505 (1967)

12) H. Großmann
Diplomarbeit 1967, Tübingen

13) D.M. Young und A.H. Lewis
Science (New York) 105, 368 (1947)

14) R.B. Merrifield, siehe l.c. 3

15) L.A. Caprino, C.A. Giza und B.A. Caprino
J. Amer. Chem. Soc. 81, 955 (1959)

16) E. Schnabel
Liebigs Ann. Chem. 702, 188 (1967)

17) S. Guttmann und R.A. Boissonas
Helv. chim. Acta 41, 1864 (1958)

18) C.R. Harrington und T.H. Mead
Biochem. J. 30, 1598 (1936)

19) G.W. Anderson und A.C. Mc Gregor
J. Amer. Chem. Soc. 79, 4686 (1957)

20) E. Wünsch, G. Fries und A. Zwick
Chem. Ber. 91, 542 (1958)

21) R. Schwyzer, P. Sieber und H. Kappler
Helv. chim. Acta 42, 2622 (1959)

22) E. Schröder und E. Klieger
Liebigs Ann. Chem. 673, 208 (1964)

23) H. Zahn, W. Dunho und B. Gutte
Z. Naturforsch. 21b, 763 (1966)

24) M. Bodanszky und V. du Vigneaud
J. Amer. Chem. Soc. 81, 5688 (1959)

25) R.B. Merrifield, siehe l.c. 4

26) J.C. Sheenan und G.P. Hess
J. Amer. Chem. Soc. 77, 1067 (1955)

27) M. Bodanszky und J.C. Sheenan
Chem. and Ind. (London) 1957 (1966)

28) S. Hörnle
Hoppe Seyler's Z. physiolog. Chem. 348, 1355 (1967)

29) R.H. Siefferd und V. du Vigneaud
J. biol. Chem. 108, 753 (1935)

30) C.H. Li, J. Meienhofer, E. Schnabel, D. Chung, T.-B. Lo und J. Ramachandran
J. Amer. Chem. Soc. 83, 4449 (1961)

31) J. du Vigneaud und O.K. Behrens
J. biol. Chem. 117, 27 (1937)

32) S. Hörnle
unveröffentlicht

33) H. Zollner
Naturwiss. Dissertation, Tübingen 1969

34) K.-H. Herzog
Naturwiss. Dissertation, Tübingen 1970

35) K. Eisele
Naturwiss. Dissertation, Tübingen 1970

36) F. Schneider
Enzymatische Katalyse, Naturwiss. Rdsch. 19, 231 (1966)

37) L.B. Smillie und B.S. Hartley
Biochem. J. 101, 232 (1966)

38) G. Weitzel, W. Schaeg, G. Boden und B. Willer
Liebigs Ann. Chem. 689, 248 (1965)

39) L. Weil, T.S. Seibles und T.T. Hersokovits
Arch. Biochem. Biophysics 11, 308 (1965)

40) H.R. Bossard, K.H. Jorgensen und R.E. Humbel
European J. Biochem. 9, 353 (1969)

41) VIII. Mitteilung: G. Weitzel, U. Weber, K. Eisele, H. Zollner und J. Martin
Hoppe Seyler's Z. physiolog. Chem. 351, 263 (1970)

42) M.J. Adams, T.L. Blundell, E.J. Dodson, G.G. Dodson, M. Vijayan, E.N. Baker, M.M. Harding, D.C. Hodgkin, B. Rimmer und S. Sheats
Nature 224, 491 (1969)

43) B.F. Erlander
Proc. N.A.S. 46, 1430 (1960)

44) E.R. Arquilla e.a.
Diabetes 18, 193 (1969)

45) Lewin S.
Biochem. J. 114, 83P (1969)

46) E. Bayer, H. Hagenmaier, G. Jung und W.A. König
"Peptides 1968", E. Bricas, Ed., North-Holland Publishing Co., Amsterdam 1968, p. 162

47) E. Bayer, H. Eckstein, K. Hägele, W.A. König, W. Brüning, H. Hagenmaier und W. Parr
J. Amer. Chem. Soc. 92, 1735 (1967)

48) T. Okuda und H. Zahn
Makromol. Chem. 121, 87 (1969)

7. LEBENSLAUF

Am 30. Dezember 1940 wurde ich, Heinz Jörg Martin, als Sohn des Kaufmanns Heinz Martin und seiner Ehefrau Dorothea, geb. Seifert, in Leipzig-Gohlis geboren.

Nach der Übersiedlung nach Westdeutschland im Jahre 1945 besuchte ich von 1947 bis 1949 in Hamburg die Olsdorfer- und Wellingbütteler Volksschule. 1950 zogen wir nach Frankfurt/Main. Ich wurde hier in der Westendschule eingeschult und besuchte anschließend das Goethe-Gymnasium. 1951 siedelten wir nach Kapstadt über. Dort besuchte ich die Deutsche St. Martini-Schule. Zwischenzeitlich waren wir wieder 2 Jahre in Frankfurt/Main, so daß ich nochmals in das Goethe-Gymnasium eingeschult wurde. Von Juni bis Dezember 1955 besuchte ich die Jan-van-Riebeck-Schule in Kapstadt; 1956 die Höhere Privatschule in Windhoek und von Januar bis Dezember 1957 die South African College High School in Kapstadt. 1958 erfolgte Rückkehr nach Frankfurt/Main, wo ich in das Wöhler-Gymnasium eingeschult wurde. 1961 legte ich dort die Reifeprüfung ab.

Nach einer zweijährigen Praktikantenzeit in der Feuerbach-Apotheke in Frankfurt/Main und bestandenem pharmazeutischem Vorexamen begann ich 1963 in Passau das Pharmaziestudium. Zum zweiten Fachsemester wechselte ich an die Universität Erlangen über und legte dort 1967 das Pharmazeutische Staatsexamen ab. Die Hälfte der Kandidatenzeit absolvierte ich in Aglasterhausen in einer Landapotheke.

Von 1968 bis 1970 bearbeitete ich unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Dr. G. Weitzel am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen die vorliegende Dissertation.

Meine akademischen Lehrer waren folgende Herren Professoren:

Physiologische Chemie:	F. May, G. Weitzel
Anorganische Chemie:	H. Behrens, R. Vogel
Organische Chemie:	H.-J. Bestmann, G. Hesse
Pharmazeutische Chemie:	H. Auterhoff, O. Dann
Pharmazeutische Technologie:	H. Sucker
Physik:	D. Eser, R. Fleischmann
Allgemeine Botanik:	W. Haupt
Spezielle Botanik:	W. Haupt, E. Kessler
Pharmakognosie:	C.G. Arnold, K. Gauckler
Pharmakologie:	F. Heim
Bakteriologie-Hygiene:	M. Knorr

Bönecke-Druck - Clausthal-Zellerfeld, Postfach 29